



**Estudo dos esfingolípidos complexos em mutantes
biossintéticos de *Saccharomyces cerevisiae***

Filipe Miguel Palatino Moreira

Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica

Dissertação orientada por:
Rodrigo Freire Martins de Almeida

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Professor Doutor Rodrigo Almeida não só por me ter aceitado no grupo de Biofísica Molecular para trabalhar no seu laboratório, mas também pela disponibilidade e pelos conselhos dados ao longo deste ano para que fosse possível a concretização deste trabalho.

Agradeço também à Professora Susana Marinho por ter acompanhado este trabalho e pelos conselhos e ideias dados e pela disponibilização de recursos do Grupo de Biologia Redox ajudando a que o trabalho avançasse.

À Professora Luísa Cyrne pela ajuda e apoio prestado ao longo do ano e ao Professor Andreas Conzelmann por ter cedido os duplos mutantes da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

À Doutora Cristina Moiteiro e ao seu grupo de trabalho por ter permitido a realização da hidrólise dos extratos bem como o uso de rotavapor. Agradeço por toda a ajuda e conselhos que foram dados durante as reuniões do grupo de Biofísica Molecular.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia (F.C.T., I.P.) pelo financiamento deste trabalho, através dos projetos PTDC/BBB-BQB/6071/2014 e UID/MULTI/00612/2013.

Aos meus colegas de laboratório, Ana Carreira, Filipa Santos, Joaquim Marquês, Hugo Filipe, Catarina Antunes e Gerson Lobo pela boa disposição, ajuda e apoio que proporcionaram ao longo deste ano. À Catarina Antunes pelo tempo despendido a ensinar-me novas técnicas bem como a esclarecer as dúvidas que apareceram ao longo do trabalho. Em especial ao Gerson Lobo, não só um colega de laboratório mas também um grande amigo, por todo apoio, brincadeiras, conversas, paciência e amizade que sempre demonstrou, independente da situação ou da ocasião que ajudaram a tornar este ano de trabalho mais divertido.

À minha família por me terem permitido ter esta oportunidade e por todo o apoio incondicional e motivação que me deram.

Por último, à Andreia pelas conversas, desabafos e toda a paciência que tiveste para mim mesmo quando as coisas não estavam a correr bem. Um grande obrigado por seres a pessoa que és e por teres estado sempre pronta para me ajudar e aturar.

Resumo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta uma composição em ergosterol e esfingolípido na membrana plasmática muito semelhante a fungos patogênicos, sendo o ergosterol o principal alvo de combate contra estes fungos. Por outro lado, estirpes de *S. cerevisiae*, como a estirpe *ipt1Δ*, que não sintetizam o esfingolípido manosil-di-(inositol fosfo)-ceramida, M(IP)₂C, apresentam uma maior resistência a agentes antifúngicos, como é o caso do miconazol e da nistatina. Uma vez que entre esta estirpe e a estirpe selvagem (*wt*) não existem variações do conteúdo de ergosterol, a origem desta resistência pode estar nos domínios formados pelos esfingolípidos.

Por esta razão, torna-se essencial perceber qual a influência dos esfingolípidos para a organização da membrana plasmática, em particular do M(IP)₂C. Com o intuito de perceber esta influência foram realizados estudos biofísicos usando células intatas de ambas as estirpes através de técnicas de espectroscopia de fluorescência. Outro passo essencial para esta compreensão é o estudo biofísico de bicamadas reconstruídas a partir de uma só classe de esfingolípidos, sendo para isso necessária a extração dos lípidos totais da levedura para obter, posteriormente, os esfingolípidos. Para que isto seja possível foi necessária uma otimização não só dos métodos de extração dos lípidos totais a usar, como também do tempo de hidrólise para a obtenção dos esfingolípidos. Foram inoculadas células de estirpes com duplas mutações (*csg2Δcsg1Δ* e *csg1Δcsh1Δ*) em meios contendo antifúngicos para testar se com estas mutações (incapacidade de realizar a síntese de manosilinositol fosfoceramida (MIPC) e consequentemente M(IP)₂C) as estirpes apresentam resistência a estes mesmos antifúngicos.

A caracterização biofísica da membrana plasmática de células intactas de ambas estirpes (*wt* e *ipt1Δ*) com a sonda 4-(2-(6-Dibutilamino)-2-naftalenil)etenil)-1-(3-sulfopropil)-piridinina (Di-4-ANEPPS) não reportou diferenças significativas, já que esta sonda responde essencialmente a variações da composição em ergosterol. Os resultados dos estudos de extração e análise de esfingolípidos mostram que os métodos de Ejlsing *et al.* (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 2136 e de Moehring *et al.* (2006) *J. Mass Spectrom.* 41: 372 são os mais adequados para a extração de lípidos totais. Mostram também que o tempo mais adequado para a hidrólise dos glicerofosfolípidos e obtenção de esfingolípidos é entre as 6 h e as 8 h. Os ensaios de sensibilidade a antifúngicos mostraram que os duplos mutantes são também resistentes aos mesmos antifúngicos, realçando a importância do M(IP)₂C na sensibilidade a estes fármacos.

Concluindo, apesar de ainda não se ter obtido cada um dos esfingolípidos complexos de *S. cerevisiae* na sua forma pura, neste trabalho houve progressos significativos na extração e separação destes lípidos; a sonda utilizada, provavelmente pela sua maior sensibilidade aos efeitos dos esteróis na membrana, não reporta diferenças na organização da membrana na ausência do M(IP)₂C. No entanto, observou-se que, tal como as células *ipt1Δ*, as estirpes com duplas mutações são mais resistentes à nistatina e ao miconazol que as células *wt*, indicando que a ausência do M(IP)₂C na membrana plasmática pode ser fundamental para esta resistência.

Palavras chave: Extratos lipídicos; Análise qualitativa de lípidos; Manosil-di-(inositol fosfo)-ceramida; Sonda Di-4-ANEPPS; Microdomínios de membrana; Levedura; Espectroscopia de fluorescência; Antifúngicos

Abstract

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a composition in ergosterol and sphingolipids in the plasma membrane similar to pathogenic fungi, being ergosterol the main target of chemical agents against these fungi. On another hand, *S. cerevisiae* cells, such as *ipt1Δ* deletion mutant, which are unable to synthesize the sphingolipid mannosyl-diinositolphosphoryl-ceramide, M(IP)₂C, show greater resistance to antifungal agents, such as miconazole and nystatin. This strain has ergosterol content similar to the wild type (*wt*) strain. Therefore, the mechanisms of this resistance may involve sphingolipid-enriched domains, namely those that are ergosterol depleted.

For this reason, it is crucial to understand the influence of these sphingolipids in the plasma membrane organization, in particular M(IP)₂C. To accomplish this goal, biophysical studies were performed with intact cells of both strains using fluorescence spectroscopy techniques. Another important approach to understand this influence is a biophysical one, making use of reconstructed bilayers from a single sphingolipid class. To do so, it was necessary to extract the lipids from yeast to obtain the sphingolipids. An optimization was required, not only for the extraction methods of total lipids but also for the hydrolysis time to obtain the sphingolipids. Moreover, cell strains with double mutations (*csg2Δcsg1Δ* and *csg1Δcsh1Δ*) were inoculated in a media containing antifungal agents to test if these mutations (inability to synthesize mannosylinositol phosphorylceramide, MIPC, and therefore M(IP)₂C) grant resistance to these same antifungals.

The biophysical characterization of the plasma membrane using intact cells of both strains (*wt* and *ipt1Δ*) with Di-4-ANEPPS showed no apparent differences because this probe responds mainly to variations in the ergosterol composition. The results show that the Ejlsing *et al.* (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 2136 and Moehring *et al.* (2006) *J. Mass Spectrom.* 41: 372 methods were the most appropriate for the lipid extraction, yet need to be optimized. They also show that the most suitable time for the hydrolysis of glycerophospholipids was between 6 and 8 hours. Antifungal resistance trials showed that strains with double mutations are also resistant to the same drugs, highlighting the importance of M(IP)₂C in the sensitivity to these drugs.

In summary, even though it was not possible to obtain each one of the *S. cerevisiae* complex sphingolipids in its pure form, there was a significant progress in the extraction and separation of these lipids in this work; the probe used, probably due to its sensitivity towards sterol effects on membranes, does not report the consequences for membrane organization of the absence of M(IP)₂C. However, it was observed that the strains with double mutations, as *ipt1Δ* cells, are more resistant to nystatin and miconazole than *wt* cells, indicating that the absence of M(IP)₂C in the plasma membrane can play a critical role in this resistance.

Keywords: Lipid extracts; Qualitative analysis of lipids; Mannosyl-diinositolphosphorylceramide; Di-4-ANEPPS Dye; Membrane microdomains; Yeast; Fluorescence spectroscopy; Antifungals

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Lista de figuras	VI
Lista de quadros	VIII
Símbolos e Abreviaturas.....	IX
1. Introdução.....	1
1.1. Enquadramento do trabalho	1
1.2. As membranas biológicas	1
1.2.1. Fases lipídicas em sistemas modelo de membranas	4
1.3. A membrana plasmática da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
1.3.1. A levedura como modelo biológico de estudo	6
1.3.2. Composição da membrana plasmática da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
1.3.3. Variabilidade do lipidoma da levedura em diferentes condições de crescimento	15
1.3.4. Extração e análise de lípidos	16
1.3.5. Organização da membrana plasmática da levedura <i>S. cerevisiae</i>	17
1.4. Espectroscopia de fluorescência no estudo das propriedades biofísicas das membranas biológicas	18
1.5. Antifúngicos.....	19
2. Objetivos	21
3. Materiais e métodos	22
3.1. Reagentes	22
3.2. Material biológico.....	22
3.3. Meios de cultura	23
3.4. Culturas celulares	23
3.5. Curvas de crescimento	24
3.6. Extração de lípidos totais da levedura em fase exponencial	24
3.6.1. Método de Folch et al. e variante deste método ⁷⁶	24
3.6.2. Método de Ejsing et al. ⁸⁴	25
3.6.3. Método de Moehring et al. ⁷⁸	25
3.7. Extração dos esfingolípidos complexos da levedura	26
3.8. Doseamento de fosfolípidos e esfingolípidos	27
3.9. Doseamento da sonda Di-4-ANEPPS.....	27
3.10. Espectroscopia de fluorescência.....	27
3.10.1. Otimização das condições experimentais para o uso da sonda Di-4-ANEPPS em <i>S. cerevisiae</i>	28
3.10.1.1. Intensidade de fluorescência	28
3.10.1.2. Cinética de incorporação da sonda na membrana plasmática da levedura <i>S. cerevisiae</i>	28
3.10.2. Espectroscopia de fluorescência em estado estacionário	28
3.10.2.1. Espectros de excitação e emissão de fluorescência	28
3.10.2.2. Anisotropia de fluorescência	29

3.10.3. Espectroscopia de fluorescência em estado transiente	29
3.11. Análise da composição dos extratos de lípidos totais e de esfingolípido por cromatografia em camada fina	30
3.12. Análise estatística	31
4. Resultados.....	32
4.1. Estudo do crescimento celular em <i>S. cerevisiae</i>	32
4.2. Estudo biofísico da membrana plasmática da levedura <i>S. cerevisiae</i> com a sonda Di-4-ANEPPS	33
4.2.1. Otimização das condições experimentais para a sonda Di-4-ANEPPS em suspensões celulares	33
4.2.2. Espectros de emissão e excitação da sonda Di-4-ANEPPS	35
4.2.3. Anisotropia de fluorescência.....	36
4.2.4. Decaimentos da intensidade de fluorescência.....	36
4.3. Análise dos extratos de lípidos totais	38
4.4. Otimização das condições experimentais para a análise de esfingolípido por cromatografia em camada fina	39
4.5. Análise dos extratos de esfingolípido.....	41
4.6. Resistência a antifúngicos.....	46
5. Discussão.....	48
5.1. Estudo biofísico da membrana plasmática da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
5.2. Análise dos extratos de esfingolípido.....	50
5.3. Resistência a antifúngicos.....	51
6. Conclusão e perspectivas futuras	53
7. Referências bibliográficas	55

Lista de figuras

Figura 1.1 – Representação da estrutura da membrana segundo o modelo do mosaico fluido de Singer e Nicholson ¹¹ .	3
Figura 1.2 – Modelo das jangadas lipídicas ¹² .	3
Figura 1.3 – Representação de algumas modificações de proteínas com partição para as jangadas lipídicas ¹⁴ .	4
Figura 1.4 – Estrutura esquemática da fase gel ^{8,19} .	5
Figura 1.5 – Estrutura esquemática de duas fases existentes em sistemas lipídicos ¹⁸ .	6
Figura 1.6 – Representação de uma curva típica de crescimento celular de uma levedura em função do tempo, bem como as diferentes fases que a compõe ^{26,27} .	7
Figura 1.7 – Representação da estrutura dos esfingolípidos complexos IPC, MIPC e M(IP) ₂ C presente nas membranas da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ³⁹ .	10
Figura 1.8 – Cromatografia obtida por Uemura <i>et al.</i> usando extratos de <i>S. cerevisiae</i> ⁴¹ .	10
Figura 1.9 – Ilustração da estrutura do inositol fosfoceramida (IPC) e da esfingomielina em cima e baixo, respetivamente ⁴² .	11
Figura 1.10 – Via de síntese da formação dos esfingolípidos da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^{39,42–44} .	12
Figura 1.11 – Variação dos níveis de base esfingóide (A) e de esfingolípidos (B) em situações de stress provocado pelo calor ⁴⁶ .	13
Figura 1.12 – Representação da estrutura química do ergosterol e do colesterol ²³ .	14
Figura 1.13 – Proposta da organização da membrana plasmática da levedura em domínios com diferentes composições em lípido e proteína ⁶¹ .	17
Figura 1.14 – Estrutura química da sonda Di-4-ANEPPS ⁶⁶ .	18
Figura 1.15 – Esquema da localização da sonda Di-4-ANEPPS numa bicamada lipídica com coexistência de fases gel (L _β), líquido desordenado (l _d) e líquido ordenado (l _o)	18
Figura 1.16 – Representação da estrutura da nistatina ⁷² .	19
Figura 1.17 – Representação da estrutura do miconazol ⁷⁴ .	20
Figura 3.1 – Fluxograma representativo dos diferentes métodos utilizados para a extração de esfingolípidos.	26
Figura 3.2 – Esquema da reação do orcinol com uma pentose.	31
Figura 4.1 – Curvas de crescimento das estirpes A (<i>csg2Δcsg1Δ</i>) a cinzento e B (<i>csg1Δcsh1Δ</i>) a preto, em meio SC.	32
Figura 4.2 – Otimização da concentração de sonda di-4-ANEPPS a utilizar na marcação da membrana plasmática numa suspensão de células da estirpe <i>wt</i> da levedura <i>S. cerevisiae</i> .	33
Figura 4.3 – Estudo da cinética de incorporação da sonda di-4-ANEPPS numa suspensão de células da estirpe <i>wt</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	34
Figura 4.4 – Espectros de excitação (– –) e emissão (–) normalizados da sonda (1 μM) incorporada na membrana plasmática das estirpes <i>wt</i> (azul) e <i>ipt1Δ</i> (laranja) da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	35
Figura 4.5 – Espectros de excitação (– –) e emissão (–) normalizados da sonda (2 μM) incorporada na membrana plasmática das estirpes <i>wt</i> (azul) e <i>ipt1Δ</i> (laranja) da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	35
Figura 4.6 – Anisotropia de fluorescência da Di-4-ANEPPS na membrana plasmática de células da estirpe <i>wt</i> (azul) e <i>ipt1Δ</i> (laranja).	36
Figura 4.7 – Decaimentos de intensidade de fluorescência da Di-4-ANEPPS na membrana plasmática da levedura (A), resíduos (B) e autocorrelação dos resíduos (C) resultantes do ajuste duma função multiexponencial.	37

Figura 4.8 – Análise da composição em glicerofosfolípidos dos extratos de lípidos totais da levedura <i>S. cerevisiae</i> obtidos pelo método de Folch et al. das estirpes <i>wt</i> e <i>ipt1Δ</i> .	39
Figura 4.9 – Análise da hidrólise do POPC (A) e da mistura de POPC/SM/Colesterol (1/1/1) (B).	40
Figura 4.10 – Análise da hidrólise da mistura de POPC/SM/Colesterol (1/1/1).	41
Figura 4.11 – Análise da hidrólise dos extratos de esfingolípidos obtidos pelo método de Folch et al. das duas estirpes de levedura <i>S. cerevisiae</i> .	41
Figura 4.12 – Análise da hidrólise dos extratos de esfingolípidos obtidos pelo método de Folch et al. das duas estirpes de levedura <i>S. cerevisiae</i> após 2 dias de revelação.	42
Figura 4.13 – Comparação de vários métodos de extração de esfingolípidos da estirpe <i>wt</i> de levedura <i>S. cerevisiae</i> por TLC.	43
Figura 4.14 – Comparação de métodos de extração de esfingolípidos das estirpes <i>wt</i> e <i>ipt1Δ</i> de levedura <i>S. cerevisiae</i> .	44
Figura 4.15 – Comparação de métodos de extração de esfingolípidos das estirpes <i>wt</i> e <i>ipt1Δ</i> de levedura <i>S. cerevisiae</i> .	
Figura 4.16 – Teste de sensibilidade de diferentes estirpes da levedura <i>S. cerevisiae</i> a dois solventes orgânicos.	46
Figura 4.17 – Teste de sensibilidade a duas classes de antifúngicos de diferentes estirpes da levedura <i>S. cerevisiae</i> .	47
Figura 5.1 – Proposta da estrutura da membrana plasmática das estirpes <i>wt</i> (esquerda) e <i>ipt1Δ</i> (direita).	50
Figura 5.2 – Cromatograma obtido por Dickson et al. ⁹³ para extratos de levedura <i>S. cerevisiae</i> da estirpe <i>wt</i> .	51

Lista de quadros

Quadro 1.1 – Denominação e abreviaturas para os glicerofosfolípidos mais comuns ^{2,35}	8
Quadro 1.2 – Composição de glicerofosfolípidos na membrana plasmática da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ³⁶	8
Quadro 1.3 – Diferentes classes de lípidos de acordo com o local de hidroxilação ^{44,45}	10
Quadro 3.1 – Estirpes utilizadas neste trabalho e respetivo genótipo	22
Quadro 3.2 – Meios de cultura utilizados para o crescimento das células da levedura <i>S. cerevisiae</i> ...23	
Quadro 4.1 – Parâmetros do crescimento celular calculados a partir da fase exponencial de crescimento das estirpes <i>csg2Δcsg1Δ</i> e <i>csg1Δcsh1Δ</i>	32
Quadro 4.2 – Parâmetros que descrevem os decaimentos de intensidade de fluorescência da sonda Di-4-ANEPPS na membrana plasmática da levedura <i>S. cerevisiae</i>	38
Quadro 4.3 – Fatores de retenção das diversas bandas obtidas na cromatografia em camada fina apresentada na figura 4.7.....	39
Quadro 4.4 – Fatores de retenção das várias bandas obtidas para os extratos de esfingolípidos, para TLC usada como comparação e para os padrões: POPC, Liso-PC, éster de colesterol, ergosterol.	43
Quadro 4.5 – Fatores de retenção das várias bandas obtidas para os extratos de esfingolípidos, para TLC usada como comparação e para os padrões: POPC e Liso-PC.	45

Símbolos e Abreviaturas

ADC	Conversor analógico-digital (<i>analog-to-digital converter</i>)
CD	Dicroísmo circular
CFD	Discriminador de função constante (<i>constant function discriminator</i>)
<i>Chol</i>	Colesterol
CL	Cardiolipina
<i>D</i>	Coeficiente de difusão lateral
DHS	Dihidroesfingosina
Di-4-ANEPPS	4-(2-(6-Dibutilamino)-2-naftalenil)etenil)-1-(3-sulfopropil)-piridinina
DOPC	1,2-Dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
DPH	1,6-Difenil-1,3,5-hexatrieno
DPPC	1,2-Dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
DRM	Membranas resistentes a detergentes (<i>Detergent-Resistant Membrane</i>)
DSC	Calorimetria diferencial de varrimento (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
Erg	Ergosterol
ESI	Ionização por <i>eletrospray</i> (<i>Electrospray Ionization</i>)
ESR	Espetroscopia de ressonância de spin eletrônico (<i>Electron Spin Resonance</i>)
FA	Ácidos gordos (<i>Fatty acids</i>)
FFEM	Microscopia eletrônica de criofatura (<i>Freeze-Fracture Electron Microscopy</i>)
<i>G</i>	Fator de correção do sistema de detecção do instrumento
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)

GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GUV	Vesícula unilamelar gigante (<i>Giant Unilamellar Vesicle</i>)
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico
I_F	Intensidade de fluorescência
I_{HH}	Componente horizontal da emissão de fluorescência com excitação horizontal
I_{HV}	Componente horizontal da emissão de fluorescência com excitação vertical
I_{VH}	Componente vertical da emissão de fluorescência com excitação horizontal
I_{VV}	Componente vertical da emissão de fluorescência com excitação vertical
IPC	Inositol fosfoceramida
LCB	Base de cadeia longa (<i>Long-Chain Base</i>)
l_d	Fase líquido desordenado
LED	Díodo emissor de luz (<i>Light Emitting Diode</i>)
Liso-PC	Lisofosfatidilcolina
l_o	Fase líquido ordenado
L_β	Fase gel
L_β'	Fase gel inclinado
LUV	Vesícula unilamelar grande (<i>Large Unilamellar Vesicle</i>)
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>)
m/m	Razão massa/massa
m/v	Razão massa/volume
MCA	Analizador de multi-canais (<i>Multichannel Analyzer</i>)
MCC	Compartimento membranal ocupado por Can1
MCP	Compartimento membranal ocupado por Pma1
MCT	Compartimento membranal ocupado por Torc2
MIPC	Manosilinositol fosfoceramida

M(IP) ₂ C	Manosil-di-(inositol fosfo)-ceramida
NL	Lípidos neutros (<i>Neutral Lipids</i>)
NMR	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
PA	Ácido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamida
PG	Fosfatidilglicerol
PHS	Fitosfingosina
PI	Fosfatidilinositol
POPC	1-Palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
PS	Fosfatidilserina
$\langle r \rangle$	Anisotropia de fluorescência em estado estacionário
RF	Fator de retenção (<i>Retention factor</i>)
SC	(Meio) sintético completo (<i>Synthetic Complete</i>)
SM	Esfingomieline
SPT	Cronometragem de fóton único (<i>Single Photon Timing</i>)
TAC	Conversor tempo-amplitude (<i>time-to-amplitude converter</i>)
t_g	Tempo de geração ou duplicação
TLC	Cromatografia em camada fina (<i>Thin-Layer Chromatography</i>)
T_m	Temperatura de transição de fase principal
<i>t</i> -PnA	Ácido todas- <i>trans</i> -9,11,13,15-octadecatetraenoico (ácido <i>trans</i> -parinárico)
UV-Vis	Ultravioleta-visível
v/v	Razão volume/volume
<i>wt</i>	Estirpe selvagem (<i>Wild type</i>)
YNB	Base de azoto para leveduras (Yeast Nitrogen Base)
YPD	Extrato de levedura, peptona e dextrose (<i>Yeast extract, Peptone, Dextrose</i>)

α_i	Amplitude (pré-exponencial normalizada) da componente i do decaimento de intensidade de fluorescência do fluoróforo
μ	Taxa de crescimento
τ_i	Tempo de vida da componente i do decaimento de intensidade de fluorescência do fluoróforo
τ_{avg}	Tempo de vida médio de fluorescência pesado pelas amplitudes
$\langle \tau \rangle$	Tempo de vida médio de fluorescência

1. Introdução

1.1. Enquadramento do trabalho

As membranas biológicas são vitais para o crescimento e sobrevivência das células, estando presente em todos os organismos vivos. O modelo mais recente que descreve estas membranas, modelo de Singer e Nicholson, toma em consideração que esta é composta por uma grande diversidade de lípidos e proteínas. Este modelo tem sido alvo de adaptações, entre elas a segregação lateral de lípidos em domínios, em particular nos denominados por jangadas lipídicas^{1,2}. No caso da levedura, o folheto externo da membrana plasmática contém níveis elevados de esfingolípido e ergosterol que podem agregar e formar domínios do tipo das jangadas lipídicas, mas que contém também outro tipo de domínios – domínios gel, formados essencialmente por esfingolípido, e desprovidos de ergosterol, descritos mais recentemente³. Os esfingolípido estão envolvidos em inúmeros processos celulares, quer como moléculas individuais, quer como componentes de domínios de membrana. Além disso, vários estudos indicam que os esfingolípido podem estar envolvidos nos mecanismos de resistência a agentes antifúngicos⁴⁻⁶. O trabalho efetuado nesta tese teve como precedente uma outra tese de Mestrado⁷ onde foram usadas duas sondas de membrana fluorescentes para o estudo da organização plasmática de duas estirpes de levedura. Os resultados obtidos mostraram que a ausência de um dos esfingolípido complexos da levedura afeta a ordem global da membrana plasmática.

Assim, por todas estas razões, torna-se evidente a importância do estudo dos esfingolípido complexos de levedura, em particular dos domínios por eles formados, tendo sido esta a motivação da realização dos trabalhos constantes da presente dissertação. Este trabalho enquadra-se nos dos principais projetos de investigação deste grupo cuja tónica é, precisamente, a relação entre os esfingolípido, os domínios na membrana e o seu papel na resistência a antifúngicos. Neste sentido diversos trabalhos realizados por este grupo como, os de Aresta-Branco *et al.*³ em que se comprovou a existência de domínios gel na membrana plasmática da levedura, os de Marquês *et al.*⁸ em que se usou sistemas modelo contendo POPC/fitoceramida e os de Castro *et al.*⁹ em que se estudou a interação de alguns antifúngicos e esfingolípido foram a justificação para a realização deste trabalho. De facto, os domínios de gel ricos em fitoceramida observados em misturas binárias apresentam propriedades semelhantes aos domínios de gel detetados *in vivo* em células de *S. cerevisiae*. Além disso, também se observou em misturas binárias que o agente antifúngico nistatina é ativo na presença de domínios gel, não sendo necessária a presença de ergosterol ou de domínios do tipo jangadas lipídicas.

Esta tese foi realizada no Centro de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e uma parte dos dados relativos a este trabalho foram publicados num artigo já submetido para revisão, e objeto de duas comunicações em forma de painel.

1.2. As membranas biológicas

As membranas biológicas servem como separação entre o conteúdo celular e o meio envolvente bem como a compartimentalização dos organelos internos¹⁰. No entanto a sua função não está apenas confinada a atuar como uma barreira dado que as membranas biológicas estão envolvidas em inúmeros tipos de interações entre o meio exterior e interior¹¹. As membranas biológicas são constituídas maioritariamente por lípidos e proteínas, sendo que as membranas plasmáticas possuem cerca de 50% de lípido e 50% de proteína em massa¹⁰. Algumas membranas podem ter uma componente glicídica, estando sempre esta associada a proteínas ou a lípidos. As biomembranas estão envolvidas em inúmeros processos biológicos, como o transporte de substâncias, quer entre células quer entre o meio intra e

extracelular, transdução de sinal, reconhecimento celular, estabelecimento e manutenção de gradientes de concentração. Assim esta é uma área de estudo importante que envolve uma dialética permanente entre abordagens e descobertas biofísicas e bioquímicas¹².

Os modelos da estrutura da membrana plasmática começaram com o modelo de Gorter e Grendel (1925). Os autores realizaram um estudo em que procederam à extração de lípidos de eritrócitos usando acetona. Os lípidos foram então colocados numa tina com água tendo-se usado uma barreira móvel para se formar um filme unimolecular contínuo. Por comparação entre as duas áreas obtidas, os autores observaram que a área ocupada pela monocamada era aproximadamente o dobro da área superficial total dos eritrócitos. Estes resultados indicaram então que os lípidos estão dispostos em duas camadas (bicamada), na qual os grupos hidrofílicos dos lípidos estão na superfície da bicamada enquanto os grupos hidrofóbicos estão no seu interior.

Mais tarde em 1935, Danielli e Davson propuseram um modelo para a estrutura da membrana que, ao contrário de Gorter e Grendel, também tentava descrever a organização das proteínas na membrana. Para os autores as proteínas globulares, únicas proteínas conhecidas na altura, contactavam com parte polar, superfície, da bicamada cobrindo os dois lados o que explicaria o fato de a tensão entre interfaces água-lípido sintéticas ter um valor superior ao valor medido para a tensão interfacial medida em células vivas. Este era um modelo estático não contendo nenhuma proteína transmembranar. Posteriormente Danielli percebeu que a membrana tinha que ser semipermeável, tendo adicionado canais transmembranares constituídos por péptidos formando poros aquosos, de modo a explicar a passagem de moléculas hidrófilas através da membrana^{11,13}.

No entanto, com o surgimento e/ou o desenvolvimento de técnicas, tais como a microscopia eletrónica de criofratura (FFEM), o dicroísmo circular (CD), ou as espectroscopias de ressonância magnética nuclear (NMR) e de *spin* eletrónico (ESR), foi possível perceber que existiriam diferentes tipos de associação de proteínas com a membrana, o que serviu de base à sua distribuição por diferentes classes, as proteínas intrínsecas e extrínsecas, e que nem toda a superfície da bicamada estaria coberta por proteínas uma vez que era possível hidrolisar facilmente os fosfolípidos membranares em meio aquoso¹¹. Estes dados associados ao facto do modelo de Danielli e Davson não conseguir esclarecer a assimetria e topologia da membrana, a diversidade de proteínas membranares bem como o não reconhecimento da dinâmica da membrana levou a que um novo modelo surgisse².

Consequentemente em 1972 Singer e Nicholson propuseram o modelo do mosaico fluido. Neste modelo a membrana é definida como “uma solução viscosa bidimensional, orientada, de proteínas anfipáticas, ou com âncoras de natureza lipídica, na qual algumas proteínas se localizam sobre a membrana, e lípidos. Para Singer e Nicholson tanto as proteínas periféricas (proteínas associadas à superfície da membrana) como as integrais (proteínas globulares e anfipáticas que têm uma grande parte do seu volume incorporado na membrana) estão distribuídas assimetricamente na membrana. os glúcidos estariam ligados a proteínas e a lípidos, glicoproteínas e glicolípidos respetivamente, sendo apenas encontrados na superfície do folheto externo da bicamada. Este modelo foi o primeiro a representar as membranas biológicas como dinâmicas, fluidas e em constante mudança, admitindo uma difusão lateral livre entre lípidos e proteínas^{2,11}.

As proteínas integrais penetram no interior hidrofóbico da membrana estando ligadas fortemente devido às interações hidrofóbicas, só podendo ser removidas por métodos violentos, recorrendo ao uso de detergentes para destruir a membrana. As proteínas periféricas são proteínas globulares solúveis em água e que se encontram ligadas à superfície da membrana por ligações mais fracas como interações

electroestáticas e ligações de hidrogénio. Podem ser facilmente removidas através de alterações na força iónica ou ajustando o pH^{2,10,11}.

Outra classe de proteínas são as proteínas ancoradas a lípidos, que no entanto podem ser consideradas como proteínas integrais com uma âncora lipídica adicional. As mais importantes âncoras lipídicas são: o ácido mirístico, o ácido palmítico, cadeias prenolípídicas e as proteínas com âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI)² e que serão referidas de novo um pouco mais adiante.

O modelo de Singer e Nicholson é aplicado às membranas de todo o tipo de células (eucariotas, procariotas) e tanto às membranas internas como externas. Apesar de algumas adaptações a que tem sido sujeito, este continua a ser o modelo mais atual para descrever as membranas biológicas¹⁴.

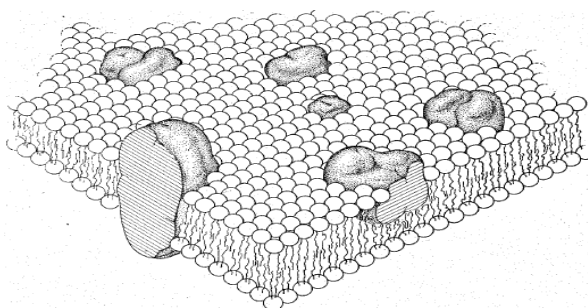


Figura 1.1 – Representação da estrutura da membrana segundo o modelo do mosaico fluido de Singer e Nicholson¹⁵. Nesta representação pode-se observar uma membrana biológica constituída por uma bicamada fluida de fosfolípidos. As proteínas periféricas encontram-se ligadas à superfície da membrana plasmática e as proteínas integrais penetram no interior hidrofóbico da mesma.

Posteriormente a noção de difusão lateral totalmente livre foi reformulada ao admitir que algumas proteínas teriam uma difusão limitada devida a interações com uma rede proteica imóvel, o citoesqueleto². Em 1997 Simons e Ikonen propuseram uma extensão a este modelo introduzindo o conceito de jangadas lipídicas. Estas estruturas são agregados rígidos de esfingolípidos e colesterol que se podem deslocar ao longo da bicamada fluida.

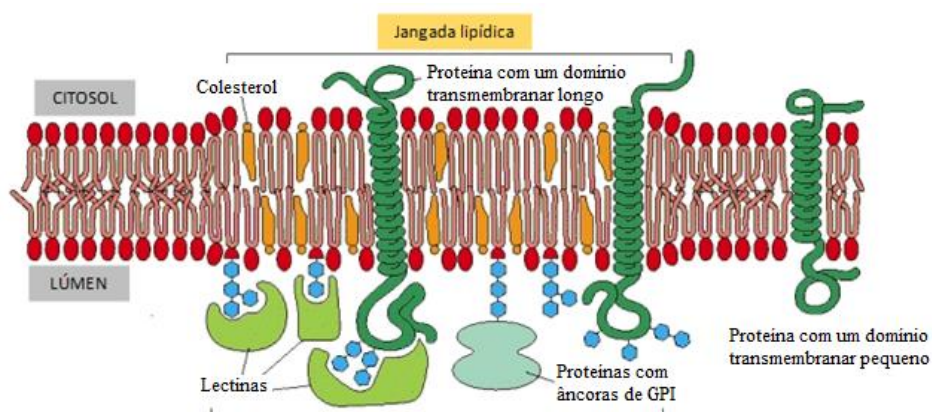


Figura 1.2 – Modelo das jangadas lipídicas¹⁶. Pode-se observar a membrana biológica constituída por uma bicamada de glicerofosfolípidos e esfingolípidos. A amarelo está representado o colesterol e a verde proteínas transmembranares. Os glicolípidos estão representados a azul. É de notar que as jangadas lipídicas têm uma espessura maior que o resto da bicamada apresentada.

Estes domínios foram inicialmente definidos como membranas resistentes a detergentes (DRM), constituindo frações insolúveis da membrana obtidas por tratamento com detergentes não iónicos suaves (1% Triton X-100, a 4 °C). No entanto resultados de vários estudos mostraram que o uso de detergentes

pode levar à quebra de ligações específicas, fazendo com que proteínas que, possivelmente, são importantes para a organização e função das jangadas possam permanecer na parte solúvel em detergente¹⁷. As jangadas lipídicas são, atualmente, definidas como domínios pequenos (10-200 nm), dinâmicos, heterogêneos, ricos em colesterol, esfingolípido que compartimentalizam processos celulares. As jangadas lipídicas podem muitas vezes ser estabilizadas, formando grandes plataformas através de interações proteína-proteína e proteína-lípido¹⁸. Estas estruturas estão envolvidas em inúmeros processos como a transdução de sinais, polaridade celular e no tráfego intracelular¹⁹.

Muitas destas interações são devidas ao direcionamento de diversas proteínas para estes domínios, em que muitas destas proteínas sofrem modificações pós-traducionais. A palmitoilação de proteínas, que consiste na adição de palmitato a resíduos de cisteína, promove o direcionamento de proteínas transmembranares para as jangadas lipídicas, uma vez que se trata duma cadeia acilo saturada que tem um bom empacotamento com aquelas regiões mais ordenadas da membrana. Já as modificações de natureza prenolípida, por exemplo, têm o efeito contrário.

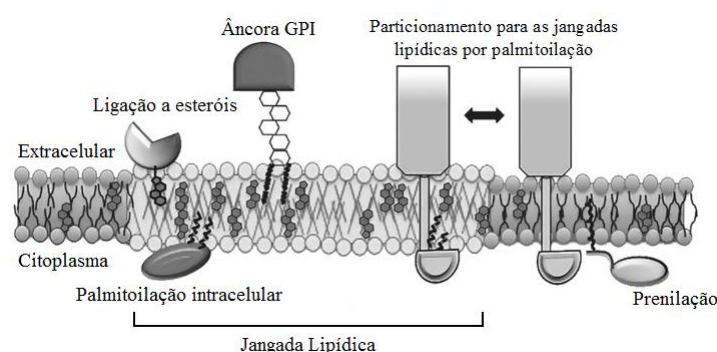


Figura 1.3 – Representação de algumas modificações de proteínas com partição para as jangadas lipídicas²⁰. Pode-se observar a bicamada constituída por esfingolípido e esterol na zona correspondente à jangada lipídica. Observa-se também modificações das proteínas favorecendo a partição para estes domínios (palmitoilação, ligação a esteróis, presença de âncoras GPI).

1.2.1. Fases lipídicas em sistemas modelo de membranas

Devido a sua natureza anfipática, os lípidos quando em contacto com a água tendem a formar agregados de modo a reduzir a exposição das partes hidrofóbicas com a água. Estes agregados podem formar fases lamelares e fases não-lamelares, sendo estas estruturas identificadas por diferentes técnicas como a difração de raios X¹¹. Nas fases não-lamelares os lípidos agregam-se em estruturas hexagonais ou cúbicas, estando relacionadas com eventos transientes nas membranas como a fusão, cisão e formação de poros. Nas fases lamelares os lípidos organizam-se segundo uma bicamada, sendo esta representativa das bicamadas lipídicas encontradas nas membranas das células²¹. A temperatura constante, as diferentes fases adotadas pelos lípidos numa situação de hidratação completa dependem, essencialmente, de: (i) do comprimento das cadeias acilo; (ii) do grau de insaturação das cadeias hidrocarbonadas; (iii) do tipo de grupo polar da cabeça do glicerofosfolípido^{22,23}.

A fase gel é mais estável numa gama maior de condições nomeadamente temperatura e hidratação possuindo cadeias acilo longas e saturadas. As ligações destas cadeias estão maioritariamente na conformação *trans*, isto é, completamente distendidas, levando a que haja um forte empacotamento por parte dos lípidos (elevada ordem das cadeias acilo), resultando numa difusão lateral muito reduzida ($D \approx 10^{-3} \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$). Nesta fase as duas cadeias acilo ocupam uma área idêntica à do grupo polar de uma

PE, pelo que, as PEs apresentam uma orientação normal ao plano da bicamada. O mesmo não sucede para fosfolípidos com um grupo polar mais largo, como o caso das PCs. De modo a garantir um empacotamento ideal, as cadeias adquirem inclinação, passando esta fase a designar-se por fase gel inclinada (L_{β}')^{11,24}.

As diferentes fases adotadas pelos lípidos dependem não só da sua composição bem como da temperatura a que a membrana se encontra. Dependendo da composição da bicamada, existe uma temperatura à qual se dá a transição entre a fase gel e a fase fluida, designada por temperatura de transição principal (T_m)^{11,25}. A temperatura de transição de fase de uma membrana lipídica corresponde à temperatura requerida para induzir a fusão dos lípidos de uma fase gel para uma fase líquido desordenado, podendo ser determinada por diferentes técnicas como a calorimetria diferencial de varrimento (DSC)^{11,24}.

A T_m traduz a estabilidade térmica da fase gel e varia tanto com o comprimento e grau de insaturação das cadeias acilo como com o tamanho da cabeça polar e o teor em água. Para cadeias mais pequenas e com insaturações a T_m é mais baixa, no entanto para cadeias com o mesmo comprimento a T_m é mais baixa para a cadeia contendo insaturações^{11,25}. Lípidos com caudas semelhantes, mas diferentes grupos polares têm diferentes temperaturas de transição, que é menor para grupos polares mais hidratados¹¹.

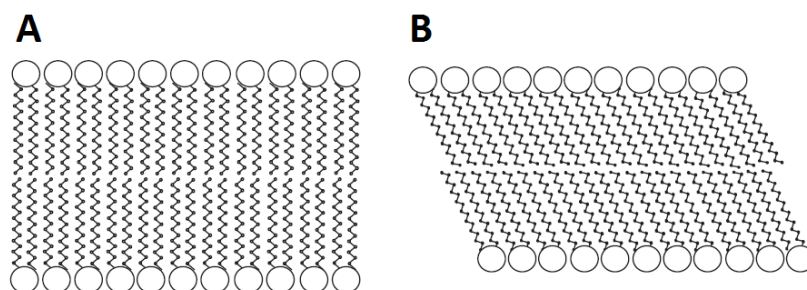


Figura 1.4 – Estrutura esquemática da fase gel^{11,25}. A – Fase gel (L_{β}); B – Fase gel inclinada (L_{β}')

Na fase fluída a bicamada lipídica possui lípidos em que os ácidos gordos possuem frequentemente uma ou mais ligações dupla *cis* (insaturadas), tendo estas ligações um efeito conformacional idêntico às conformações *gauche*, levando ao surgimento de desvios nas cadeias. O número de conformações *gauche* nesta fase, comparativamente à fase gel, é elevado, levando à ocorrência dos chamados “defeitos de cadeia”, resultando num encurtamento das mesmas^{11,26}. Devido a estes fatores as regiões fluídas apresentam uma menor espessura comparativamente com regiões mais compactas bem como uma baixa ordem rotacional e translacional e um aumento dos movimentos das cadeias acilo dos fosfolípidos^{25,26}. Nesta fase há um aumento da área transversal ocupada pela cadeia pelo que não existe a necessidade de terem inclinação, mesmo para fosfolípidos com grupos polares largos, como o caso da PC. Devido a este aumento da área por cadeia, as cabeças polares dos fosfolípidos estão em média mais afastadas, o que favorece a penetração de moléculas de água entre as mesmas (aumento da hidratação da fase gel para esta fase)¹¹. Em suma, esta fase quando comparada com a fase gel tem um pior empacotamento, ocupa uma área por lípido maior, é mais fluida, é mais permeável, é menos espessa, é menos estável e é mais dinâmica ($D \approx 1 \mu m^2 s^{-1}$)².

Os esteróis encontram-se em grande abundância na membrana plasmática de células eucariotas, pelo que é importante perceber quais as alterações provocadas pela sua presença. O conceito de fase líquido ordenado (l_o) foi usado para descrever estas bicamadas contendo esteróis e glicerofosfolípidos ou esfingolípidos²⁶. Quando incorporado numa fase fluída, o colesterol é intercalado entre as cadeias

acilo devido à sua hidrofobicidade. Deste modo interage com estas cadeias forçando-as a adquirir uma conformação maioritariamente *trans* (elevada ordem das cadeias acilo tal como na fase gel). Quando o colesterol se incorpora numa fase gel existe um aumento da difusão translacional (semelhante à fase líquido desordenado) mantendo-se as conformações *trans*^{24,25}.

Quando comparada com a fase fluída típica, ou seja, a fase líquido desordenado (l_d), a fase l_o apresenta i) uma maior espessura da bicamada lipídica; ii) um aumento da rigidez; iii) diminuição da área da secção transversal da molécula de fosfolípido; iv) difusão translacional semelhante, embora ligeiramente mais lenta ($D < 1 \mu m^2 s^{-1}$)^{11,26}.

Com esta nova noção designaram-se os domínios de ergosterol e glicerofosfolípidos (ou esfingolípido) de l_o enquanto os domínios que correspondia à fase fluída designaram-se por domínios l_d .

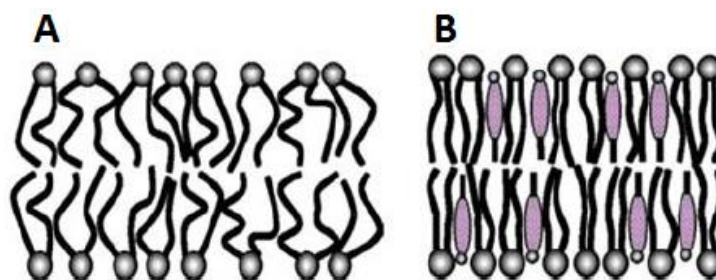


Figura 1.5 – Estrutura esquemática de duas fases existentes em sistemas lipídicos²⁴. A – Fase líquido desordenado (l_d ou L_α); B – Fase líquido desordenado (l_o)

1.3. A membrana plasmática da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

1.3.1.A levedura como modelo biológico de estudo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* adquiriu um lugar de referência como organismo modelo para estudos bioquímicos. O início do uso dos organismos modelos deveu-se à necessidade de ultrapassar limitações implícitas a outros organismos, sendo assim possível ultrapassar restrições éticas e experimentais bem como desenvolver e otimizar métodos analíticos que facilitam e padronizam as análises. Estes organismos têm que ser representativos de uma larga classe de seres vivos, para quaisquer fenómenos ou processos que a comunidade científica esteja interessada em estudar²⁷.

O uso de leveduras como modelo de estudo é devido às vantagens que esta apresenta, nomeadamente: i) tem um genoma completamente sequenciado; ii) tem um rápido crescimento; iii) tem diversas semelhanças com organismos multicelulares eucariotas, como os fungos (nomeadamente a nível da organização intracelular, mecanismos de replicação e metabolismo); iv) fácil manipulação do seu DNA (é possível fazer o *knockout* de genes de um modo relativamente fácil e sem comprometer a viabilidade); v) não é patogénico; vi) é um sistema muito mais simples e fácil de trabalhar^{28–30}.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido um organismo bastante utilizado no que diz respeito ao estudo de processos relacionados com lípidos, visto que possui um lipidoma bastante mais simples comparativamente com outros organismos multicelulares. Isto permitiu um avanço na compreensão do metabolismo de lípidos neutros, homeostasia de esfingolípido, interações fisiológicas entre os esfingolípido e os esteróis, bem como a integração do metabolismo lipídico nos sinais do ciclo celular e na proliferação celular²⁹.

O crescimento de organismos como a levedura pode ser feito em condições aeróbias em meio líquido podendo-se controlar facilmente a fase de crescimento em que estas se encontram. O crescimento celular das leveduras tem perfil típico constituído por 5 fases: a fase *lag*, a fase exponencial, a mudança diaúxica, a fase pós-diaúxica e a fase estacionária (Figura 1.5)^{31,32}.

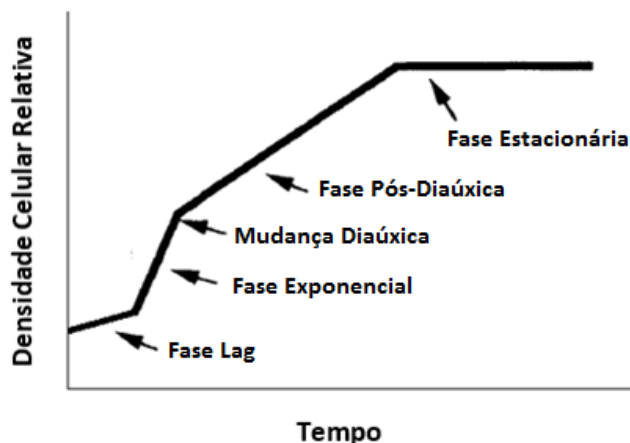


Figura 1.6 – Representação de uma curva típica de crescimento celular de uma levedura em função do tempo, bem como as diferentes fases que a compõe^{31,32}.

A primeira fase, fase *lag*, é caracterizada por uma adaptação das células ao meio de crescimento. Foi descrita, inicialmente, como uma fase dormiente uma vez que a taxa divisão celular é baixa. Esta ideia está a ser posta de parte visto que está associada a esta fase uma grande atividade metabólica. A fase seguinte, fase exponencial, tem um rápido desenvolvimento celular, que se deve ao facto de as células estarem adaptadas ao meio, possuindo essencialmente metabolismo fermentativo. A mudança diaúxica dá-se quando a fonte de carbono, glucose, se esgota e as células necessitam de se adaptar ao metabolismo respiratório. Na fase seguinte, a fase pós-diaúxica, a taxa de crescimento é menor devido ao esgotamento da fonte de carbono e ao uso de outra forma de obtenção de energia, usando o etanol acumulado na fase exponencial. Após todo o conteúdo nutritivo se esgotar, as células apresentam uma taxa de crescimento muito reduzida ou mesmo nula, sendo por isso designada por fase estacionária. Nesta fase há uma grande redução da taxa metabólica, no entanto esta não é nula porque as células mantêm-se vivas. As células, nesta fase, são sujeitas a várias modificações morfológicas e fisiológicas, tornando-se termotolerantes, desenvolvem paredes celulares mais espessas e são mais resistentes ao *stress* oxidativo³¹⁻³⁴.

1.3.2.Composição da membrana plasmática da *Saccharomyces cerevisiae*

As células de levedura possuem uma composição lipídica mais simples do que a de organismos multicelulares, inclusive a de outros fungos. Ainda assim as suas principais características gerais são comparáveis com o lipidoma de qualquer outra célula eucariota²⁹.

Os glicerofosfolípidos, também designados por fosfoacilgliceróis, são os lípidos mais comuns nas membranas. São constituídos por dois resíduos de ácidos gordos (cadeias acilo), região hidrófoba, ligados por uma ligação éster ao primeiro e segundo carbono do glicerol, e um grupo muito polar, carregado, que se liga ao terceiro carbono por uma ligação fosfodiéster (cabeça), sendo por isso moléculas anfipáticas. As cadeias acilo podem ser saturadas ou insaturadas, a sua nomenclatura indica o número de átomos de carbonos e o número de insaturações. A designação dos glicerofosfolípidos é feita de acordo com o álcool polar que se encontra na cabeça^{2,15}. De seguida encontram-se as denominações bem como as abreviaturas para os glicerofosfolípidos mais comuns.

Quadro 1.1 – Denominação e abreviaturas para os glicerofosfolípidos mais comuns^{2,35}.

Nome genérico	Nome sistemático	Grupo polar	Abreviatura
Ácido fosfatídico	Ácido 1,2-diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfórico	Hidrogénio	PA
Fosfatidilcolina	1,2-diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina	Colina	PC
Fosfatidiletanolamina	1,2-diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina	Etanolamina	PE
Fosfatidilserina	1,2-diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoserina	Serina	PS
Fosfatidilglicerol	1,2-diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoglicerol	Glicerol	PG
Fosfatidilinositol	1,2-diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo-1'-mio-inositol	Inositol	PI
Cardiolipina (Difosfatidilglicerol)	1',3'-Bis-(1,2-diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo)- <i>sn</i> -glicerol	Fosfatidilglicerol	CL

A pH fisiológico (pH 7) o PA, PS, PG, PI e CL são aniónicos (têm carga global negativa), enquanto a PC e a PE são zwitteriónicos (têm carga global neutra)^{11,15}.

No quadro seguinte encontra-se a percentagem de cada glicerofosfolípido presente na membrana plasmática da levedura retirada de diferentes artigos. As variações apresentadas entre estudos podem ter origem em dificuldades técnicas e diferentes graus de purificação da membrana plasmática, como se comenta no parágrafo seguinte, mas podem também ser genuínas, uma vez que o lipidoma da levedura pode ser bastante variável, como será discutido na Secção 1.3.3 Independentemente disso, é possível fazer algumas generalizações com base nos valores desta tabela, que se discutem brevemente de seguida.

Quadro 1.2 – Composição de glicerofosfolípidos na membrana plasmática da levedura *Saccharomyces cerevisiae*³⁶. A – Zinser *et al.* (1991)³⁶; B – Tuller *et al.* (1999)³⁷; C – Patton e Lester (1991)³⁸; D – Blagović *et al.* (2005)³⁹; E – Pedroso *et al.*⁵⁷.

	% de fosfolípido total				
	A	B	C	D	E
PC	16,8	11,3	17	18,9	12,5
PE	20,3	24,6	14	16,5	25
PI	17,7	27,2	27,7	36,7	31,3
PS	33,6	32,2	3,8	4,8	14,4
PA	3,9	3,3	2,5	13,3	15,6
CL	0,2	–	4,2	6,3	–
Outros	6,9	1,4	–	3,5	–
Estirpe utilizada	X-2180	FY1679	W303-1B	¹⁾	BY4741

1) *Saccharomyces uvarum*, estirpe 21 da coleção microbiana da Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb.

As classes de glicerofosfolípidos mais abundantes são a PC, PE, PI e PS e seus respetivos derivados sendo a PA e CL os menos predominantes na membrana plasmática. As diferenças observadas

entre as diferentes percentagens da mesma classe de fosfolípido podem ser devidas ao uso de diferentes estirpes da levedura *S. cerevisiae*. Observa-se que na membrana plasmática não existe PG mas sim a sua forma dimérica ligada a um glicerol, a cardiolipina (CL). Este lípido encontra-se em grande abundância na membrana interna mitocondrial devido à sua importância bioenergética^{29,36}. A presença de CL na membrana plasmática pode, pois, ser também um indicador de contaminação com fração mitocondrial. As cadeias mais abundantes dos ácidos gordos que compõem os glicerofosfolípidos referidos anteriormente são o ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), o ácido esteárico (C18:0) e ácido oleico (C18:1). A levedura *S. cerevisiae* apenas apresenta ácidos gordos, no máximo, com uma insaturação²⁸.

O PA, um dos glicerofosfolípidos menos abundantes na membrana plasmática, é o menor e mais simples glicerofosfolípido sendo por isso o precursor de todos os restantes fosfolípidos. A PE possui uma cabeça polar que não só é quimicamente reativa como também é pequena e fracamente hidratada. É um fosfolípido essencialmente estrutural que na ausência de outros fosfolípidos tem maior tendência a formar fases não lamelares. A PC tem uma forma global cilíndrica visto que o grupo polar tem aproximadamente a mesma largura que a soma das suas caudas apolares. A razão destes dois glicerofosfolípidos, PC e PE, é um parâmetro importante na manutenção da curvatura da membrana. A PS está envolvida em processos de ativação e ancoragem de proteínas membranares tais como ATPases, cinases, recetores e proteínas envolvidas na transdução de sinais. Está também envolvida em processos de comunicação e reconhecimento. A importância do fosfatidilinositol é a sua função como sinalizador celular estando ligado a eventos regulatórios na membrana plasmática de células eucariotas. Existem também evidências de que o PI está envolvido na síntese de ceramidas contendo fosfato de inositol. Este glicerofosfolípido existe numa quantidade muito mais elevada na membrana plasmática de levedura do que em mamífero, podendo indicar que também possui um papel estrutural^{2,22,28}.

Um dos aspetos fundamentais acerca das membranas biológicas é a assimetria na distribuição dos glicerofosfolípidos ao longo da bicamada. No caso da levedura, o folheto externo é maioritariamente constituído por PC ao passo que a PE, PI e PS predominam no folheto interno. Uma vez que tanto o PI como a PS são glicerofosfolípidos aniónicos (são carregados negativamente) o folheto interno da membrana plasmática vai ter uma maior carga negativa. A assimetria observada deve-se a diversos fatores nomeadamente i) propriedades biofísicas que determinam a capacidade dos lípidos em atravessar a bicamada espontaneamente; ii) mecanismos que mantêm os lípidos num folheto da bicamada; iii) presença de transportadores que mediam a translocação dos lípidos (por exemplo flipases)^{2,22,40,41}.

Os esfingolípídeos são outra classe de lípidos anfipáticos que pode ser encontrada nas biomembranas. São constituídos por uma base esfingóide e um álcool, do mesmo tipo que os álcoois que se encontram nos glicerofosfolípidos. Este álcool liga-se ao terceiro carbono da base por uma ligação fosfodiéster ou glicosídica. A base esfingóide, que é uma ceramida, é formada pela condensação dum ácido gordo com uma amina de longa cadeia alifática hidroxilada e muitas vezes *trans*-insaturada¹⁵.

Ao contrário dos glicerofosfolípidos os esfingolípídeos encontrados em levedura possuem uma composição diferente aos encontrados em células animais. Nas células animais a principal base de cadeia longa (LCB) é a esfingosina ao passo que na *S. cerevisiae* é uma fitoesfingosina (PHS). A principal diferença reside no facto de não possuir uma ligação dupla ente os carbonos 4 e 5 (C₄ e C₅), presente na esfingosina, tendo então um grupo hidroxilo no C₄.

A presença do grupo hidroxilo no C₄ pode ter um grande impacto na formação de fases ao longo da membrana plasmática. Estudos revelaram que interações envolvendo este grupo podem ser importantes para a estabilização de domínios muito ordenados e rígidos (domínios gel)⁸. A presença

destes domínios pode estar relacionada com a estabilidade dos compartimentos celulares presentes na levedura (que será mencionada no tópico 1.3.6).

Os esfingolípídeos complexos presentes na membrana da levedura são o inositol fosfoceramida (IPC); o manosilinositol fosfoceramida (MIPC); o manosil-di-(inositol fosfo)-ceramida ($M(IP)_2C$). Estes esfingolípídeos são constituídos por uma fitoceramida que contém uma base de cadeia longa (LCB) contendo quase sempre 18 átomos de carbono a qual se liga, através de uma ligação amida, a uma cadeia acilo contendo, na sua maioria, 26 átomos de carbono ou, ocasionalmente, 24 átomos de carbono e, geralmente, com duas hidroxilações⁴².

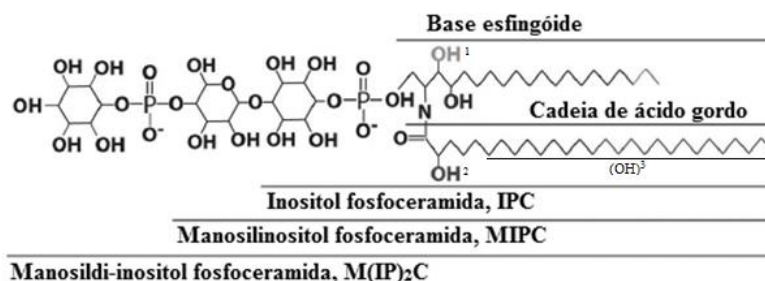


Figura 1.7 – Representação da estrutura dos esfingolípídeos complexos IPC, MIPC e $M(IP)_2C$ presente nas membranas da levedura *S. cerevisiae*⁴³.

Os esfingolípídeos complexos de levedura podem, ainda, ter subclasses (A, B, B', C e D) de acordo com a posição e/ou números de hidroxilações no esqueleto de ceramida.

Quadro 1.3 – Diferentes classes de lípidos de acordo com o local de hidroxilação^{44,45}. Os números 1, 2 e 3 correspondem à posição onde ocorre a hidroxilação, estando os locais assinalados na figura 1.7. A presença de hidroxilação é assinalada na tabela com + e ausência com -.

Posição de hidroxilação	Tipo A	Tipo B	Tipo B'	Tipo C	Tipo D
1	-	+	-	+	+
2	-	-	+	+	+
3	-	-	-	-	+

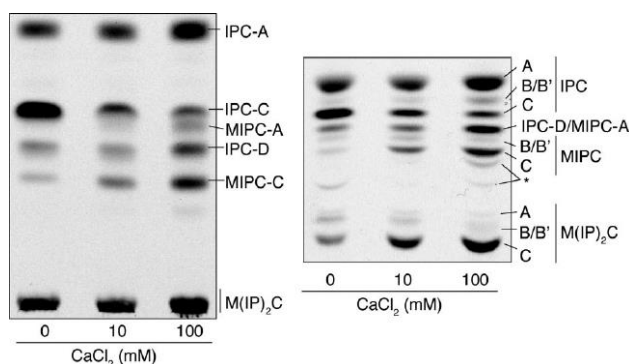


Figura 1.8 – Cromatografia obtida por Uemura et al. usando extratos de *S. cerevisiae*⁴⁵. Pode-se separar e identificar nos cromatogramas as diferentes subclasses de esfingolípídeos presentes na levedura *S. cerevisiae* com incubação de diferentes concentrações de cálcio. Na cromatografia apresentada à esquerda usou-se como sistema de solventes clorofórmio/metanol/ácido acético/água (16/6/4/1,6, v/v/v/v) enquanto na da direita usou-se clorofórmio/metanol/amónia 4,2 N (9/7/2, v/v/v). As bandas foram detetadas por autoradiografia, estando a dihidroesfingosina marcada radioativamente.

Como se pode observar nos cromatogramas anteriores a separação de esfingolípídeos complexos de levedura é um processo bastante complicado devido à diversidade de diferentes subclasses do mesmo

esfingolípido. Este processo torna-se ainda mais complexo uma vez que sistemas de solventes com pequenas diferenças podem levar a resoluções muito distintas e certas subclasses são apenas visíveis com um determinado sistema de solventes. Acresce ainda o facto de que pequenas alterações no meio de crescimento celular (neste caso a presença de cálcio) produzem diferenças marcadas a nível da síntese não só das classes de esfingolípidos como também das suas subclasses.

As diferenças entre os esfingolípidos presentes nas células de levedura e nas células animais não se esgotam apenas na base de cadeia longa. Os principais esfingolípidos de levedura possuem um fosfato de inositol ao passo que nas células animais os esfingofosfolípidos possuem um fosfato de colina.

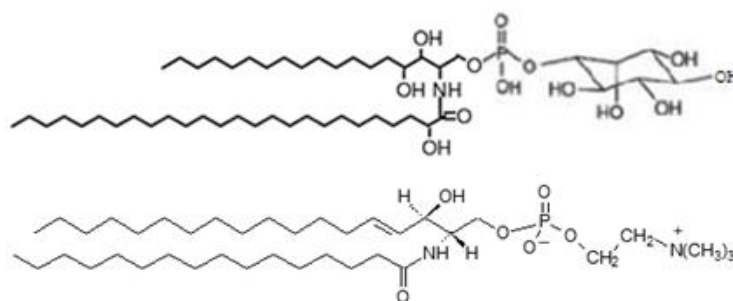


Figura 1.9 – Ilustração da estrutura do inositol fosfoceramida (IPC) e da esfingomielina em cima e baixo, respetivamente⁴⁶.

A síntese dos esfingolípidos em *Saccharomyces cerevisiae* começa com a condensação de uma serina com um palmitoil-CoA, formando a 3-cetodihidroesfingosina. A 3-cetodihidroesfingosina é então reduzida a dihidroesfingosina (DHS), uma cadeia de base longa. A hidroxilação no C₄ da DHS dando origem à base esfingóide, fitoesfingosina. À amina desta base esfingóide liga-se um ácido gordo com uma cadeia longa dando origem à fitoceramida. A fitoceramida é modificada através da transferência de um fosfato de inositol, proveniente de um PI, para o grupo 1-OH originando o IPC. O IPC é posteriormente manosilado formando o MIPC sendo o passo final a transferência de outro fosfato de inositol para o MIPC originando o M(IP)₂C, considerado o esfingolípido complexo mais abundante na membrana plasmática da levedura *S. cerevisiae* wild type (wt). Na figura 1.7 está representada esquematicamente a via de biossíntese destes esfingolípidos^{43,46-48}.

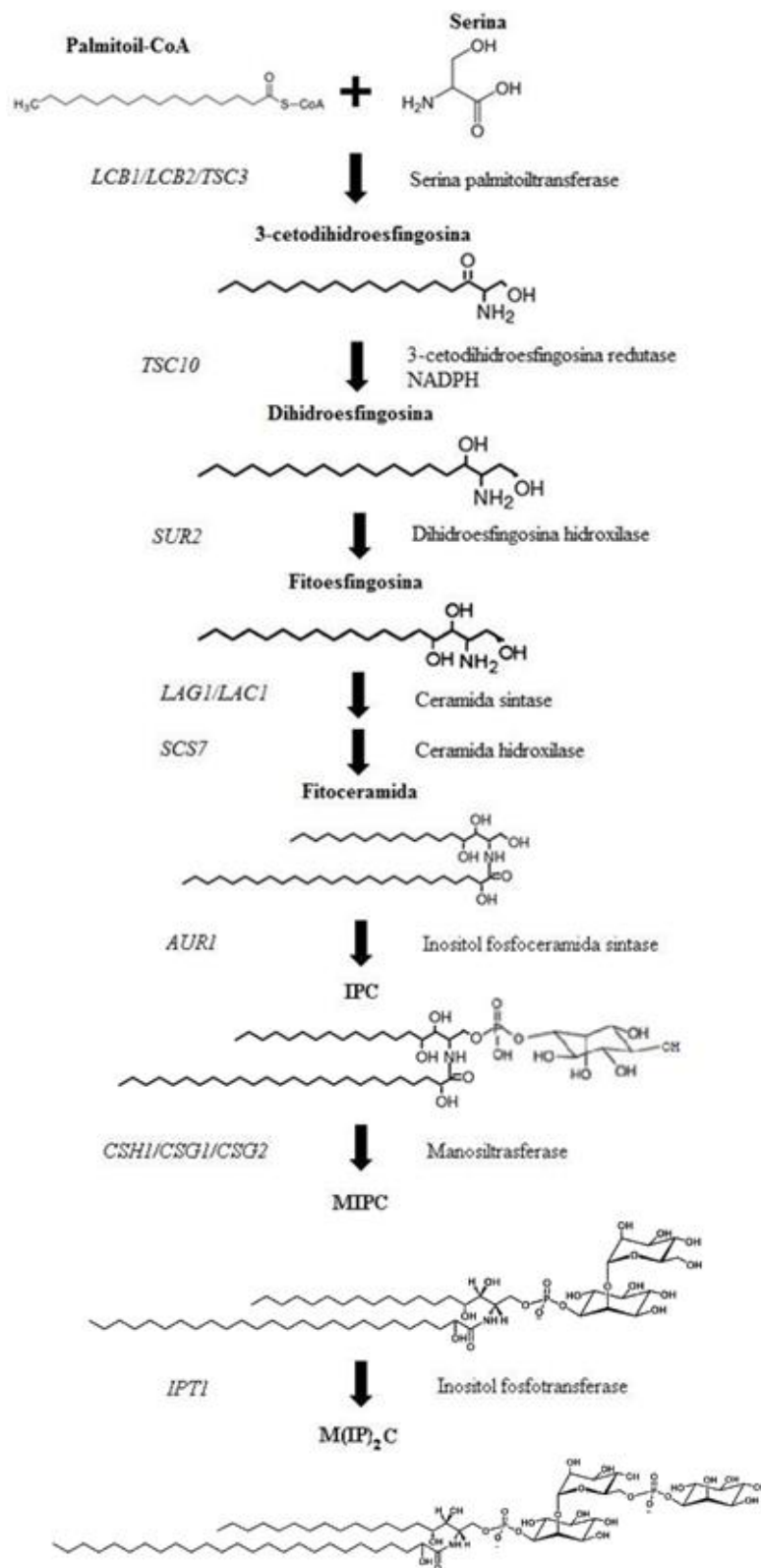


Figura 1.10 – Via de síntese da formação dos esfingolípídeos da levedura *S. cerevisiae*^{43,46–48}. À esquerda das setas encontra-se o gene que codifica o enzima que catalisa a reação e à direita encontra-se o nome do enzima que catalisa a reação.

Estudos em estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* com deleções do gene *ipt1* mostraram ausência total da atividade do M(IP)₂C sintase e, conseqüentemente, ausência deste esfingolípido. O *csg1* e o *csh1* codificam para dois enzimas, homólogos, com atividade de manosiltransferase. Aquando da

deleção destes dois genes, há ausência desta atividade, não ocorrendo a síntese do MIPC, e um aumento da sensibilidade ao cálcio externo. O *csg2*, que codifica para uma proteína de ligação ao cálcio, interatua com estes dois genes (pode-se considerar uma subunidade reguladora). Estudos de mutantes com a deleção do *csg2* juntamente com o *csg1* mostraram que não havia nenhuma atividade catalítica da manosiltransferase, ao passo que a deleção do *csg2* com o *csf1* mostraram apenas uma redução, apesar de acentuada, da atividade desta enzima⁴⁵.

Contudo, estas deleções não levam apenas à ausência de um esfingolípido, mas ao aumento do esfingolípido anterior. Assim no caso da deleção do gene *ipt1* (um dos mutantes usados neste trabalho) observa-se um aumento do MIPC, enquanto para a deleção dos genes *csg1/csf1* ou *csg2/csg1* (os outros mutantes utilizados nesta tese) pode-se observar um aumento do IPC, esfingolípido anterior na via de síntese. Isto pode indicar que as células de levedura têm a capacidade de controlar a sua composição em esfingolípidos totais, compensando a ausência de um com o aumento do anterior^{46,47}.

Os esfingolípidos estão presentes essencialmente na membrana plasmática, e correspondem a 30 mol % dos fosfolípidos ou a cerca de 7% da massa da membrana plasmática. Na membrana plasmática de estirpes *wt* de *S. cerevisiae* o M(IP)₂C corresponde a cerca de 75% enquanto, sendo o esfingolípido maioritário, ao passo que os restantes 25% estão divididos entre o IPC e MIPC^{46,48}. Esta síntese ocorre, predominantemente, no retículo endoplasmático (RE) embora a conversão de ceramida a IPC possa ocorrer tanto no RE como no complexo de Golgi. As conversões de IPC a MIPC e MIPC a M(IP)₂C ocorrem no complexo de Golgi²⁸.

Os esfingolípidos complexos são uma classe de lípidos estruturais envolvidos em processos biológicos. Estes processos envolvem a divisão celular, transdução de sinais, respostas a *stress* provocado pelo calor, tolerância alcalina e ao ácido, endocitose, apoptose e transporte vesicular de proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi^{43,48,49}.

Na resposta ao *stress* provocado pelo calor existe uma adaptação do metabolismo da levedura levando a um aumento dos níveis de esfingolípidos bem como da base esfingóide dos mesmos.

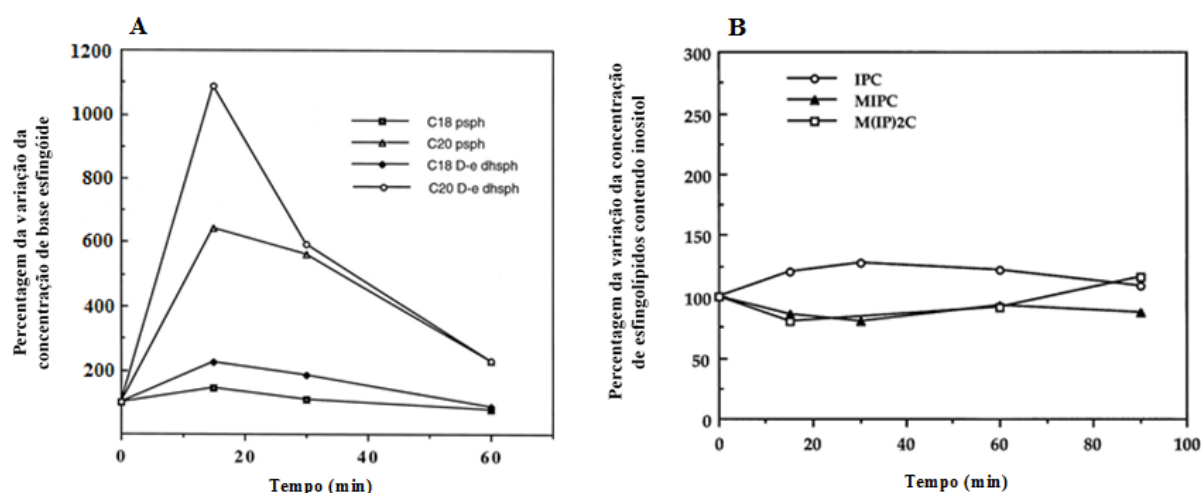


Figura 1.11 – Variação dos níveis de base esfingóide (A) e de esfingolípidos (B) em situações de *stress* provocado pelo calor⁵⁰. Os gráficos foram retirados do artigo de Jenkins *et al.* podendo-se observar um aumento dos níveis da base esfingóide, em especial para as que contêm 20 átomos de carbono, e aumento de IPC e M(IP)₂C.

O efeito mais pronunciado é o aumento das bases esfingóides (fitoesfingosina e dihidroesfingosina) contendo 20 átomos de carbonos. Como referido anteriormente a base esfingóide

que se encontra presente nos esfingolípídeos da levedura *S. cerevisiae* contem, na sua grande maioria, 18 átomos de carbono. Esta mudança pode ser bastante importante para a sobrevivência da célula quando exposta a situações adversas. Estas alterações sugerem que, quando expostas a condições de *stress*, os esfingolípídeos possam ter uma função mais regulatória em vez da função estrutural que possuem em condições normais. Estes podem então atuar como segundos mensageiros nos processos adaptativos ao meio, permitindo assim que a levedura se consiga adaptar ao aumento da temperatura havendo depois o crescimento celular⁵⁰.

Outro papel dos esfingolípídeos é o aumento da tolerância a condições alcalinas e ácidas. Em casos em que as células se encontram em situações de pH ácido, os esfingolípídeos alteram as propriedades físicas da membrana. As cadeias acilo destes esfingolípídeos, muito longas, saturadas e hidroxiladas, a sua interação com esteróis e a capacidade de formar ligações de hidrogénio levam a uma bicamada mais compacta, mais espessa e menos permeável^{51,52}.

Uma classe de lípidos que só pode ser encontrada nas células eucariotas são os esteróis. Possuem um sistema rígido de quatro anéis fundidos (um com cinco átomos de carbono e três com seis átomos de carbono), correspondente à parte hidrofóbica da molécula, e um grupo –OH hidrófilo (figura 1.12). Inserem-se na membrana com o seu grupo hidroxilo polar junto ao grupo carbonilo dos fosfolípídeos e estabelece ligações de H com o grupo amida dos esfingolípídeos^{2,10,11,15}. Dentro da classe de esteróis o colesterol, encontra-se presente nas células de mamífero, e o ergosterol, presente nas células de levedura e fungos, são os maioritários.

As leveduras, ao contrário das células animais, não possuem colesterol, tendo como esteroide maioritário o ergosterol, sendo a principal diferença deste para o colesterol a presença de mais duas duplas ligações (uma num anel B e outra na cadeia alifática, no C22) em vez de uma e a presença de um grupo metilo adicional na cadeia alifática, no C24⁵³.

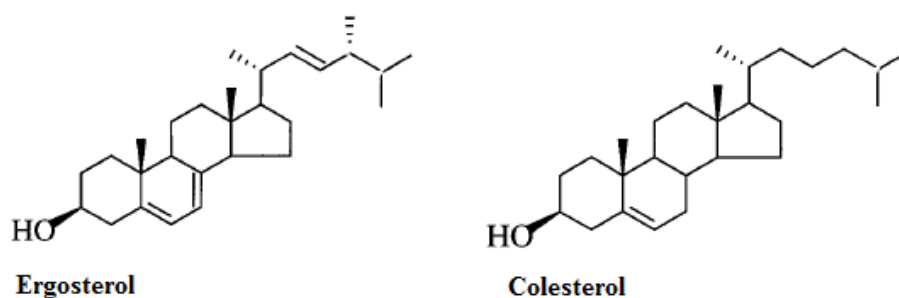


Figura 1.12 – Representação da estrutura química do ergosterol e do colesterol²⁸.

As diferenças referidas entre estes dois esteróis têm, numa primeira aproximação, um impacto reduzido na estrutura e dinâmica da membrana, uma vez que ambos formam, juntamente com os esfingolípídeos, domínios l_o (jangadas lipídicas). No entanto, apesar de induzirem a formação do mesmo tipo de fase lipídica, a presença do grupo metilo bem como a dupla ligação adicional afetam quantitativamente os parâmetros biofísicos da membrana, quer em sistemas modelo, quer na membrana plasmática em células vivas. Assim a cadeia alifática saturada que se encontra presente no colesterol leva a que esta tenha uma grande capacidade para aumentar o potencial de dipolo da membrana tendo um grande impacto biológico, afetando as interações entre lípidos nas jangadas lipídicas, a permeabilidade da membrana e a inserção de proteínas de membrana (bastante importante nas jangadas lipídicas). A presença do grupo metilo na cadeia alifática do ergosterol confere a este esteroide a especificidade para a interação com lípidos saturados (esfingolípídeos). O ponto comum entre estes dois

esteróis e que os distingue dos seus precursores, o zimosterol, é a presença de uma dupla ligação no C6 que confere a estes dois esteróis a habilidade de formar a fase l_o , propriedade ausente no seu precursor⁵⁴.

As pequenas diferenças estruturais entre o ergosterol e o colesterol, e as suas consequências biofísicas, também têm impacto na ação de antifúngicos, tendo estes obrigatoriamente uma especificidade muito maior para o ergosterol do que para o colesterol. Diversos estudos indicam que a maior rigidez da molécula de ergosterol leva a uma formação de complexos mais estáveis com as moléculas de antifúngico através de ligações de hidrogénio^{55,56}.

1.3.3. Variabilidade do lipidoma da levedura em diferentes condições de crescimento

A membrana plasmática é bastante dinâmica e a sua composição pode variar de modo a adaptar-se às condições em que se encontra.

Um exemplo desta adaptação é a modificação da composição da membrana plasmática quando exposta a H_2O_2 . Nestas condições existe uma adaptação da célula, ao modificar a síntese de diversos lípidos, havendo um aumento da razão PC/PE e uma diminuição dos níveis de ácidos gordos de cadeia muito longa e hidroxilada e um aumento dos ácidos gordos de cadeia muito longa mas sem hidroxilações. Isto leva a uma diminuição da permeabilidade da membrana permitindo à levedura que sobreviva nestas condições⁵⁷.

Assim, para perceber até que ponto o lipidoma de levedura é flexível, compreender as implicações que esta flexibilidade pode ter a nível dos parâmetros biofísicos e da organização da membrana plasmática e para poder comparar resultados de diferentes autores, obtidos em condições experimentais diversas, é importante perceber qual a influência de diferentes condições de crescimento celular (como a temperatura, fonte de carbono e fase de crescimento) na composição lipídica da membrana plasmática da levedura. Em geral, a fonte de carbono é a que tem maior impacto na composição lipídica geral, embora a passagem da fase exponencial para a estacionária e o crescimento a uma temperatura inferior a 15 °C também levem a grandes alterações no lipidoma²⁹.

O efeito da temperatura foi testado com o crescimento das células a 15, 24, 30 e 37 °C, com o aumento da temperatura ocorreu um aumento da abundância de PI e uma diminuição da PE, no entanto não houve grande variação nos níveis de PC bem como de PS e PA. Em relação aos esfingolípidos, à temperatura mais baixa o esfingolípido predominante era o $M(IP)_2C$, mas com o aumento da temperatura o IPC tornou-se o esfingolípido maioritário tendo havido uma diminuição de $M(IP)_2C$. O ergosterol também registou um aumento apesar de subtil²⁹.

Quanto às diferentes fases de crescimento, pode-se observar que aquando da passagem da fase *lag* para a fase exponencial (fase *mid-log*), existe uma diminuição de mais de 75% da abundância do PI e uma diminuição de 50% para a PE. Os níveis de PC e PS permaneceram constantes ao longo das diversas fases de crescimento ao passo que para a PA ocorreu uma diminuição significativa entre a transição entre fase pós-diaúxica e a fase estacionária. Em relação aos esfingolípidos os níveis de IPC diminuem ao longo das fases de crescimento, era o esfingolípido mais abundante, enquanto os níveis de MIPC aumentam. Os níveis de $M(IP)_2C$ mantiveram-se constantes ao longo das diversas fases de crescimento. Relativamente ao ergosterol houve uma redução subtil da fase exponencial para a fase pós-diaúxica²⁹.

De modo a perceber a influência da fonte de carbono no lipidoma da levedura as células foram incubadas em meios de cultura contendo glucose, rafinose ou glicerol. O único glicerofosfolípido que

não foi afetado é a PE, para o qual os níveis foram idênticos para as várias fontes de carbono. Em relação à PA os seus níveis são mais elevados para a rafinose e mais baixos para a glucose. A PC tem níveis mais baixos para a rafinose, enquanto num meio com glicerol tem níveis mais elevados. A PS e o PI têm níveis mais elevados em meio com glucose; no entanto, a PS tem níveis mais baixos na rafinose, ao passo que para o PI esses níveis ocorrem no meio contendo glicerol. Em relação aos esfingolípidos o IPC era a classe mais abundante num meio com glucose e o M(IP)₂C num meio contendo rafinose e glicerol²⁹.

1.3.4.Extração e análise de lípidos

Os lípidos têm sido reconhecidos como fundamentais para o regulamento e controlo das funções celulares e no aparecimento de diversas doenças. Assim, a lipidómica tem sido uma área com forte crescimento nos últimos anos, tendo levado a um ressurgimento do interesse nos métodos de extração de lípidos a partir de células.

Para a composição lipídica das membranas celulares ser passível de análise é então necessária a extração destes a partir de um homogenato de células, sendo preciso separar os componentes lipídicos dos componentes não lipídicos (proteínas, minerais). Blight e Dyer⁵⁸ desenvolveram um dos primeiros métodos para esta extração, sendo ainda muito utilizado. Este método usava um sistema de solventes de clorofórmio/metanol/água (1/1/0,9, v/v/v) onde o material lipídico ficava dissolvido no solvente orgânico e o restante material na fase aquosa podendo depois ser retirada. Apesar de ser um método adequado para a extração de grande parte dos lípidos, não era recomendado para extrair os lípidos mais hidrófilos (dentro dos esfingolípidos encontram-se alguns dos lípidos mais hidrofóbicos, como a ceramida, e alguns dos mais polares, como os glicosfingolípidos), uma vez que haveria grande probabilidade de uma parte significativa destes permanecerem na fase aquosa, necessitando de modificações para que se obtivesse uma extração mais eficiente. Muitos autores adicionaram ácido ou bases para otimizar a extração, contudo esta adição pode induzir a hidrólise de muitos lípidos obtendo-se lípidos que não existiriam *in vivo*. Assim, apesar dos avanços ocorridos nesta área, a extração de lípidos ainda é um processo complicado com níveis de eficiência relativamente baixos, em particular para esfingolípidos. Os resultados de Hanson e Lester⁵⁹ mostraram que variações nas condições de extração, como por exemplo a temperatura, podem afetar drasticamente o rendimento desta, não existindo ainda um método aceite pela comunidade científica como o mais eficiente para a extração de lípidos o que, juntamente com a variabilidade e flexibilidade do lipidoma da levedura, também pode implicar problemas de reprodutibilidade.

Após a extração dos lípidos estes podem ser analisados por diversos métodos como as cromatografias em camada fina (TLC) e a cromatografia gasosa (GC). Geralmente na análise por TLC os lípidos são marcados radioactivamente (por exemplo, inositol tritiado para a visualização dos esfingolípidos e de fosfolípidos contendo inositol) revelando-se a placa cromatográfica por autorradiografia, havendo uma diminuição do limite de deteção comparativamente à revelação com iodo e outros agentes reveladores (limite de deteção de TLC por vapor de iodo alguns µg, dependendo do grau de insaturação dos lípidos em questão, orcinol entre 0,5 e 1 mg, ácido sulfúrico entre 1 e 2 µg por classe de lípidos, enquanto que para o GC é entre 1 e 20 ng⁶⁰). Estes métodos oferecem uma resolução, sensibilidade e seletividade que, sendo suficiente para muitas aplicações, para o detalhe requerido nos atuais estudos de lipidómica, apenas darão indicações gerais, ou poderão ser utilizados como um primeiro método de separação. De modo a ultrapassar estes problemas têm sido usadas outras técnicas com maior sensibilidade como a espectroscopia de massa com uma ionização suave, ionização por electrospray (ESI) e ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). Esta técnica tem uma

resolução muito elevada, com valores de razão massa/carga que permite identificar todas as espécies de lípidos⁶¹.

Apesar destes métodos serem mais eficazes para a identificação de lípidos (e sua quantificação usando os padrões internos adequados) não é possível obter os esfingolípídeos purificados sendo apenas métodos de análise. Assim neste trabalho usou-se a cromatografia em camada fina porque, apesar de ter uma resolução mais baixa, é possível obter os esfingolípídeos purificados.

1.3.5. Organização da membrana plasmática da levedura *S. cerevisiae*

A membrana plasmática é uma mistura de lípidos e proteínas organizadas numa bicamada de forma homogênea. Porém dados mais recentes mostram que tanto os lípidos como as proteínas se encontram distribuídos de uma forma heterogênea na membrana plasmática formando diversos microdomínios com diferentes composições, estruturas e funções^{17,62}. Esta compartimentalização é importante para a manutenção da polaridade celular bem como para a transdução de sinais⁶³. Neste tipo de microdomínios surgem as jangadas lipídicas que eram definidas como membranas resistentes a detergentes iónicos, uma vez que eram frações insolúveis de membranas extraídas por detergentes não iónicos (Triton X-100).

Na membrana plasmática da levedura reconhecem-se pelo menos 3 microdomínios: i) o MCC – compartimento membranar ocupado pela Can1; ii) o MCT – compartimento membranar ocupado pela proteína Torc2; iii) o MCP – compartimento membranar ocupado pela Pma1⁶³.

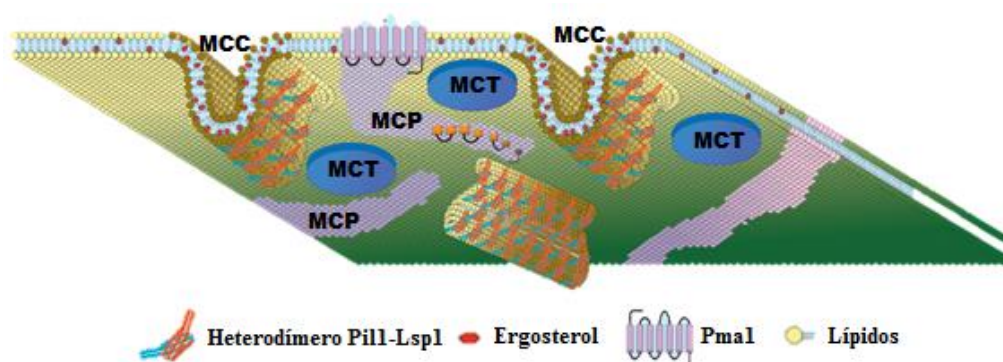


Figura 1.13 – Proposta da organização da membrana plasmática da levedura em domínios com diferentes composições em lípido e proteína⁶³.

No estudo do papel dos lípidos no transporte membranar, em condições fisiológicas, observou-se que a permease de arginina Can1 marcada com uma proteína fluorescente, a GFP, não está distribuída homogeneamente ao longo da membrana plasmática, mas está concentrada em cerca de 50-80 domínios/célula com 300 nm de diâmetro. Estes microdomínios são ricos em ergosterol e são revestidos por eisossomas (complexos de proteínas membranares, que contêm heterodímeros Pili-Lsp1) e a deleção do Pili leva à não formação destes compartimentos. Em estirpes de levedura com mutações ao nível das vias de síntese de ergosterol e esfingolípídeos, observou-se que a Can1 marcada com a GFP tinha uma distribuição homogênea indicando que estes lípidos são necessários para a formação de domínios contendo esta permease. Como foi referido anteriormente, as jangadas lipídicas são definidas como domínios l_o ricos em esfingolípídeos e esterol. Uma vez que estes microdomínios exibem uma elevada marcação com filipina evidenciando assim uma elevada concentração em esteróis, isto poderá indicar que os microdomínios MCC são domínios líquido l_o ^{17,63,64}.

O complexo 2 alvo da rapamicida (Torc2) localiza-se no MCT. Em levedura o Torc2 está envolvido em inúmeros processos tais como a organização dos filamentos de actina, endocitose, polarização celular bem como na regulação do metabolismo dos esfingolípídeos. Uma hipótese para a formação deste compartimento reside no facto de complexos individuais de Torc2 que se encontram ligados à membrana plasmática poderem interatuar de modo a formar complexos dinâmicos ordenados. Outra hipótese é o direccionamento deste complexo pelo seu domínio de homologia à plectrina, ligando-se especificamente 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol^{63,65}.

A proteína mais abundante na membrana plasmática da levedura é a Pma1 não pertence a nenhum dos compartimentos falados anteriormente, acumulando-se no seu próprio compartimento, o MCP. O Pma1 associa-se com os esfingolípídeos durante o seu transporte para a membrana plasmática, sendo por isso considerado o domínio MCP rico em esfingolípídeos. Atualmente, é sabido que a membrana plasmática da *S. cerevisiae* contém domínios ricos em esfingolípídeos desprovidos de ergosterol, formando domínios gel³. A descoberta destes domínios sugere que os MCP possam, em termos lipídicos, corresponder a estes domínios muito rígidos e ordenados do tipo gel⁶³.

1.4. Espectroscopia de fluorescência no estudo das propriedades biofísicas das membranas biológicas

A espectroscopia de fluorescência tem sido uma técnica muito utilizada no estudo das membranas por ser uma técnica com alta sensibilidade, não invasiva e que cria o mínimo de perturbação nas membranas. A espectroscopia de fluorescência permite estudar as propriedades biofísicas da membrana como a ordem, polaridade, hidratação através de uso de marcadores fluorescentes, sondas^{66,67}.

As membranas, geralmente, não possuem fluorescência intrínseca pelo que se adicionam sondas, por exemplo a 4-(2-(6-Dibutilamino)-2-naftalenil)etenil)-1-(3-sulfopropil)-piridinina (Di-4-ANEPPS), de modo a estudar as propriedades biofísicas da membrana por técnicas de fluorescência.

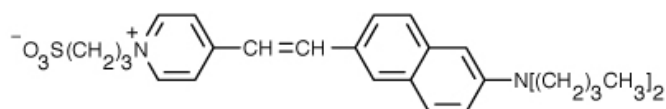


Figura 1.14 – Estrutura química da sonda Di-4-ANEPPS⁶⁸.

Esta sonda tem uma partição especial por domínios l_o , sendo sensível à presença de ergosterol. Com o aumento dos níveis deste esteroide esta sonda apresenta tempos de vida mais longos bem como um deslocamento do comprimento de onda máximo de emissão para o azul (comprimentos de onda inferiores)⁶⁹.

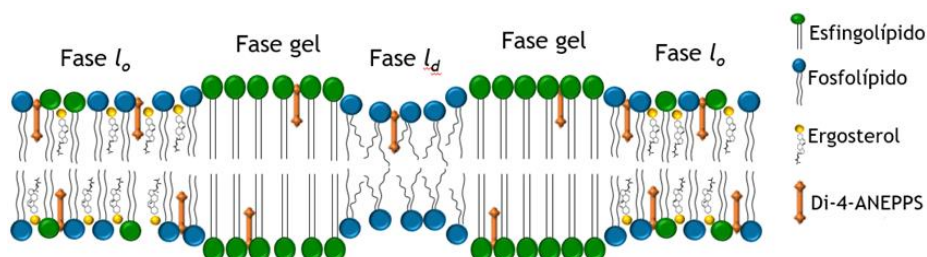


Figura 1.15 – Esquema da localização da sonda Di-4-ANEPPS nas diferentes fases lamelares lipídicas de uma bicamada. As cabeças polares dos esfingolípídeos estão representadas a verde; e as cabeças dos fosfolípídeos a azul. O ergosterol está representado a amarelo como um sistema de anéis. Na bicamada lipídica estão representadas as várias fases: fase gel (L_β), líquido desordenado (l_d) e líquido ordenado (l_o). A sonda di-4-ANEPPS apresenta partição preferencial para os domínios l_o .

Dentro da espectroscopia de fluorescência um dos parâmetros mais importantes é a anisotropia de fluorescência. A anisotropia mede a extensão de rotação molecular de um fluoróforo, fornecendo dados sobre a rigidez de diversos ambientes moleculares bem como do tamanho e forma do fluoróforo. A anisotropia de fluorescência é devida existência de momentos de transição para a absorção e emissão que se encontram ao longo de direções específicas dentro da estrutura do fluoróforo. Esta é uma medida do deslocamento angular médio do fluoróforo que ocorre entre a absorção e a consequente emissão de um fóton. Este deslocamento angular depende da velocidade e extensão da difusão rotacional durante o tempo de vida do estado excitado, que é dependente do microambiente em que se encontra o fluoróforo. Assim, nos casos mais comuns, se uma sonda estiver num meio fluido, onde tem maior liberdade rotacional, o valor de anisotropia vai ser próximo de zero ao passo que se a sonda se encontrar num ambiente com elevado grau de rigidez vai-se obter um valor de anisotropia próximo de 0,4^{11,70}.

Outra técnica importante para o estudo das propriedades biofísicas é a fluorimetria resolvida no tempo. Esta técnica tem sido muito utilizada no estudo do tipo, fração, composição e tamanho de domínios e fases lipídicas presentes em membranas biológicas. Os decaimentos de intensidade de fluorescência dão-nos informação relativa não só ao tempo de vida de um fluoróforo no estado excitado, ou seja, o tempo médio que o fluoróforo permanece no estado excitado, após absorção da luz, até ocorrer a emissão de fluorescência, mas também à existência de várias populações num estado excitado, cada uma delas com a sua amplitude e tempo de vida e que estão relacionadas com a heterogeneidade da membrana^{66,67,70}.

1.5. Antifúngicos

Na última década as infeções causadas por fungos têm aumentado a um ritmo elevado, infetando maioritariamente pacientes com sistema imune debilitado ou mesmo suprimidos (como o caso de doentes com HIV, fibrose quística, diabetes, sujeitos a transplantes de órgãos, quimioterapias agressivas e mesmo idosos). Os fármacos usados para o tratamento das infeções fúngicas são tóxicos e têm um baixo espetro de atividade, surgindo em muitos casos o aparecimento de resistência dos agentes patogénicos aos fármacos usados, tendo muitos destes compostos efeitos secundários no organismo do doente, como por exemplo a insuficiência renal, sendo estes efeitos principais na administração oral⁷¹⁻⁷³. Atualmente têm sido usados três classes de antifúngicos: azole, polieno e equinocandinas⁷³.

Os polienos, como o caso da nistatina, são constituídos, geralmente, por moléculas cíclicas e anfipáticas com 26 a 40 átomos de carbono. O carácter anfifílico, onde as quatro duplas ligações formam a superfície hidrofóbica (apolar) e os grupos hidroxilo, carboxilo e cetona formam as regiões hidrófilas (polares)^{71,72}.

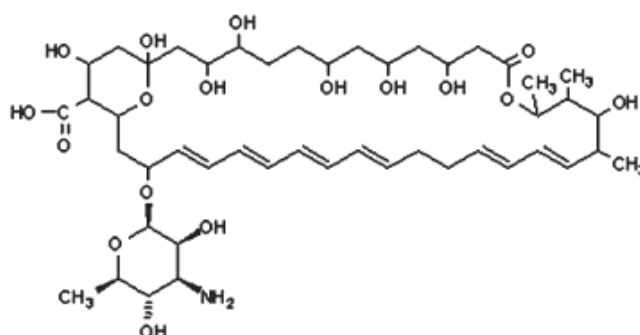


Figura 1.16 – Representação da estrutura da nistatina⁷⁴. Pode-se observar a molécula cíclica de nistatina bem como as duplas ligações conjugadas que formam a parte hidrofóbica e os grupos hidroxilo, carboxilo e cetona que formam a parte hidrófila.

Estes compostos têm uma maior afinidade para membranas contendo ergosterol em relação a membranas contendo colesterol, devido à sua estrutura mais rígida bem como a presença duplas ligações (mais duas que o colesterol) e a presença de um grupo metilo adicional na cadeia alifática⁷⁴. Em baixas concentrações existe uma deposição dos monómeros de polieno junto à superfície da bicamada, levando à destabilização da bicamada junto à zona de adsorção, perturbando a ordem e o grau de hidratação, principalmente dos fosfolípidos com que interatua. Com o aumento da concentração, estes compostos inserem-se na membrana com uma orientação aproximadamente perpendicular à anterior, levando ao desaparecimento das perturbações descritas anteriormente e ao aparecimento de poros transmembranares, caso a densidade de moléculas de polieno e a rigidez da membrana onde este se inseriu sejam suficientes e adequados para a formação de agregados altamente organizados. Em membranas em que existe a presença de colesterol ou de nenhum esterol é necessária uma maior acumulação de polienos para haver a formação dos poros transmembranares⁷⁵. Estes poros levam ao aumento da permeabilidade da membrana e consequentemente à dissipação do gradiente de prótons, levando à morte celular⁷⁶.

O miconazol pertence uma outra classe de antifúngicos, os azoles. Esta classe tem na sua estrutura um imidazol contendo dois átomos de azoto, sendo esta substituição no anel azole.

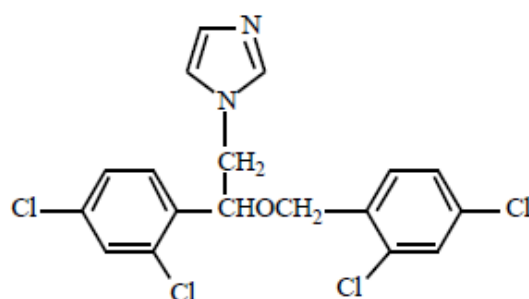


Figura 1.17 – Representação da estrutura do miconazol⁷⁷. Pode-se observar o anel azole contendo dois átomos de azoto, sendo o grupo mais importante para atividade deste composto.

Estes compostos atuam ao nível da síntese do ergosterol, inibindo o enzima 14 α desmetilase, (EC 1.14.13.7) através da ligação do átomo de azoto no anel azole ao átomo de ferro do grupo heme que se encontra presente neste enzima. A inibição deste enzima leva à acumulação de esteróis metilados no carbono 14 α interrompendo a síntese de ergosterol e levando à síntese de compostos tóxicos, como o 14-methylergosta-8,24(28)-dien-3,6-diol e o ergosta-8,14-dienol. Estes compostos sintetizados não são capazes de exercer a mesma função que o ergosterol, resultando numa membrana plasmática com uma organização diferente, cuja função está comprometida^{72,78}.

Tal como a nistatina, o miconazol também tem uma preferência para o ergosterol quando comparado com o colesterol, observando-se que para o mesmo efeito é necessária uma concentração muito maior⁷⁸. Diversos genes estão envolvidos na resistência a este antifúngico tais como o *skn1*, *ipt1*, *sur1* e o *erg3*, todos eles genes que estão envolvidos na síntese de esfingolípídeos ou ergosterol. Como foi referido anteriormente, os esfingolípídeo e o ergosterol (no caso da levedura) formam domínios designados por jangadas lipídicas, porém a redução na abundância ou a alteração nas propriedades biofísicas destes domínios, relativamente ao *wt*, interfere com a atividade do miconazol⁶.

2. Objetivos

Estudos realizados com esta levedura mostram que a estirpe *ipt1Δ* tem uma maior resistência a antifúngicos, como a nistatina⁵. Visto que esta estirpe tem uma composição lipídica semelhante a estirpe *wt* tendo como única diferença a deleção do gene *ipt1* que leva à eliminação do enzima que catalisa a conversão de MIPC a M(IP)₂C, a sensibilidade da levedura a fármacos poderá estar relacionada com este esfingolípido. Isto sugere que este esfingolípido poderá ser um alvo para atuação dos antifúngicos, sendo importante estudar a sua influência na membrana plasmática da levedura e de que modo a sua ausência induz a resistência a estes compostos. É então necessário investigar o impacto da ausência do M(IP)₂C na organização da membrana plasmática, sendo um dos objetivos deste trabalho. Para isso foi realizado uma caracterização biofísica da membrana plasmática de ambas as estirpes com a sonda Di-4-ANEPPS.

Outro dos objetivos é a obtenção dos esfingolípidos, IPC, MIPC e M(IP)₂C, a partir dos lípidos totais de levedura das diferentes estirpes. Posteriormente à obtenção dos esfingolípidos pretendia-se estudar o efeito de cada classe na organização da membrana plasmática através de estudos biofísicos usando bicamadas reconstruídas com estes esfingolípidos. Para isso é necessário extrair os lípidos totais da levedura e posterior hidrólise para obter os esfingolípidos. Para tal foram utilizados diversos métodos de extração de lípidos e diferentes tempos de hidrólise para determinar as condições mais adequadas para a obtenção dos esfingolípidos. Teve-se também como objetivo a análise, por cromatografia em camada fina, dos extratos de lípidos totais e dos extratos de esfingolípidos.

Por fim pretendia-se verificar o comportamento da estirpe *wt* e *ipt1Δ* na presença de antifúngicos e observar as diferenças entre estas estirpes e os duplos mutantes *csg2Δcsg1Δ* e *csg1Δcsh1Δ* em que não há a síntese do MIPC (não possuem o enzima manosiltransferase ativo). Pretendeu-se também observar a influência de dois solventes orgânicos (etanol e metanol) no crescimento destas quatro estirpes uma vez que podem perturbar a membrana plasmática.

3. Materiais e métodos

3.1. Reagentes

A bacto-peptona, o extrato de levedura, a *yeast nitrogen base* (YNB), e o bacto agar foram adquiridos na Difco. A solução aquosa de Ludox [sílica coloidal diluída 50 % (m/m)], o ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico (HEPES), o ditioneitol (DTT) e a solução de metilamina (33 % em etanol) provieram da Sigma-Aldrich. Da Merck foram adquiridos o ácido perclórico (HClO₄), o dihidrogenofosfato de sódio (NaH₂PO₄), o cloreto de sódio (NaCl), o molibdato de amônio [(NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O], o hidrogenocarbonato de amônio (NH₄HCO₃), o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e o Tris(hidroximetil)aminometano (Tris). Dos solventes orgânicos, o clorofórmio foi obtido à Fischer Chemical, o metanol espectroscópico à VWR. À Panreac foram adquiridos o etanol absoluto, o hidróxido de sódio (NaOH), a piridina e o ácido sulfúrico. O ácido acético foi comprado à J. T. Baker e o ácido ascórbico à Carlo Erba. Relativamente à sonda de membrana, o 4-(2-(6-Dibutilamino)-2-naftalenil)etenil-1-(3-sulfopropil)-piridinina (Di-4-ANEPPS) foi adquirido à Invitrogen. Esta sonda encontra-se guardada em etanol espectroscópico a -20 °C. Dentro dos lípidos sintéticos, o 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC) foi adquirido à Lipoid, e o 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (PE) à Avanti Polar Lipids, sendo o seu grau de pureza > 99%. Os lípidos de fonte natural, o ergosterol, o L- α -fosfatidilinositol (PI) proveniente de semente de soja, a L- α -fosfatidilserina (PS) proveniente de cérebro de bovino e a lisofosfatidilcolina proveniente da gema de ovo foram adquiridos na Sigma-Aldrich. O ácido 2-hidroxioléico foi gentilmente fornecido pelo Lipopharma Therapeutics. As soluções tampão utilizadas nesse trabalho foram designadas por tampão A (NaH₂PO₄·H₂O 100 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4); tampão B (NH₄HCO₃ 150 mM, pH 8,0) e tampão C (Tris 25 mM, EDTA 5 mM, pH 8,5), tendo sido preparadas com água bidestilada e desionizada obtida através de um sistema Gradiente Milli-Q da MILLIPORE.

3.2. Material biológico

Neste trabalho usaram-se quatro estirpes de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, tendo duas sido adquiridas à EUROSCARF (*wt* e *ipt1Δ*). As restantes duas (duplos mutantes) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Andreas Conzelmann, professor jubilado da Universidade de Fribourg.

Quadro 3.1 – Estirpes utilizadas neste trabalho e respetivo genótipo

Estirpe	Número ACC	Genótipo
<i>wt</i>	Y00000	BY4741 <i>MATa</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i>
<i>ipt1Δ</i>	Y04007	Isogénica à BY4741 com YDR072c::KanMX4
<i>csg2Δcsg1Δ</i>	SUY07	Isogénica à BY4741 com <i>cgs1Δ</i> ::URAMX; <i>csg2Δ</i> ::KanMX
<i>csg1Δcsh1Δ</i>	SUY42	Isogénica à BY4741 com <i>cgs1Δ</i> ::URAMX; <i>csh1Δ</i> ::KanMX

A estirpe *ipt1Δ* apresenta uma deleção no gene *ipt1* que codifica para o enzima inositol fosfotransferase (EC 2.7.8). Os duplos mutantes *csg2Δcsg1Δ* e *csg1Δcsh1Δ* apresentam a deleção dos genes *csh1*, *csg1* e *csg2* não conseguindo sintetizar o MIPC.

3.3. Meios de cultura

Os meios de culturas utilizados ao longo deste trabalho para o crescimento das diferentes estirpes da levedura *S. cerevisiae* estão descritos no quadro 3.1.

Quadro 3.2 – Meios de cultura utilizados para o crescimento das células da levedura *S. cerevisiae*.

Meio de cultura	Composição
Meio líquido rico YPD	Peptona 2% (m/v); extrato de levedura 1% (m/v); glucose 2% (m/v)
Meio líquido SC (<i>Synthetic Complete</i>)	Glucose 2% (m/v); YNB 6,85% (m/v); triptofano 0,005% (m/v); histidina 0,01% (m/v); leucina 0,01% (m/v); adenina 0,0025% (m/v); uracilo 0,0025% (m/v); treonina 0,02% (m/v); serina 0,04% (m/v); arginina 0,02% (m/v); metionina 0,02% (m/v); tirosina 0,03% (m/v); isoleucina 0,03% (m/v); lisina 0,03% (m/v); fenilalanina 0,05% (m/v); valina 0,15% (m/v); ácido aspártico 0,1% (m/v); ácido glutâmico 0,1% (m/v)

As soluções de glucose e YNB foram autoclavadas a 120 °C durante 20 min e as soluções de aminoácidos foram autoclavados a 110 °C durante 20 min. Na preparação de meio líquido rico YPD, os meios são autoclavados a 120 °C durante 20 minutos, sendo a glucose apenas adicionada ao meio no momento da sua utilização.

3.4. Culturas celulares

As suspensões celulares das estirpes de levedura encontram-se preservadas numa solução de glicerol a 20 % (v/v), a uma temperatura de – 80 °C (*stock*). Removeram-se algumas células de uma das suspensões celulares e preparou-se um riscado em meio sólido YPD numa caixa de Petri. Esta cultura foi a incubar numa estufa a 30 °C durante 2 dias, sendo posteriormente guardada a uma temperatura de 4 °C. Os riscados foram renovados, a partir do riscado anterior, de 15 em 15 dias. Após três renovações foi feito novo riscado a partir das suspensões celulares. Foi a partir destes riscados que se fizeram as pré-culturas, o que consiste em inocular as células da estirpe pretendida num volume de meio de crescimento líquido, SC ou YPD, tendo sido depois incubadas num agitador orbital a uma velocidade de 160 rpm e a uma temperatura de 30 °C durante a noite.

Após o crescimento, mediu-se a absorvência (densidade ótica) da suspensão celular a 600 nm num espectrofotómetro. Estas medidas permitem estimar o número de células que se encontram na cultura, uma vez que recorrendo a um hemocitómetro determinou-se que $1 A_{600} \approx 2,94 \times 10^7$ células/mL.

Para a cultura de células inoculou-se o meio de crescimento com um determinado volume de células da pré-cultura de modo a que esta tivesse o valor de absorvência inicial pretendida. Estas

medições de absorvência foram realizadas num espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis.

3.5. Curvas de crescimento

As curvas de crescimento dos duplos mutantes *csg2Δcsg1Δ* e *csg1Δcsh1Δ* da levedura *S. cerevisiae* foram obtidas em meio SC, de modo a comparar o seu crescimento com a estirpe *wt*. Inicialmente, foram preparadas pré-culturas de cada estirpe, sendo no dia seguinte inoculados 50 mL de meio com as células da pré-cultura da estirpe para uma densidade celular de 0,05 A₆₀₀. Após a preparação foi lida a absorvência das amostras a 600 nm entre curtos intervalos de tempo.

Com este ensaio pretendeu-se calcular a taxa de crescimento celular (μ) e o tempo de geração ou duplicação (t_g). O crescimento de uma população microbiana é dado por:

$$N = N_0 \cdot e^{\mu t} \quad \text{Equação 3.1}$$

Em que N corresponde ao número de células num determinado tempo t , N_0 corresponde ao número de células iniciais, isto é, no instante $t = 0$, t é o tempo e μ é a taxa de crescimento.

O tempo de geração é definido como o intervalo de tempo necessário para que o número de célula duplique, sendo determinado por:

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{Equação 3.2}$$

Este parâmetro depende da composição do meio de crescimento e das condições ambientais em que se encontra a cultura.

3.6. Extração de lípidos totais da levedura em fase exponencial

Para se proceder à extração dos lípidos totais foram inoculados 500 mL de meio YPD com células das diferentes estirpes da levedura *S. cerevisiae*, para uma densidade celular inicial de 0,085 A₆₀₀/mL. A cultura foi a incubar num agitador orbital, a uma velocidade de 160 rpm, a 30 °C e durante 5 horas. Após as 5 horas as células encontram-se na fase exponencial⁷. Escolheu-se realizar a extração nesta fase uma vez que não existem grandes variações a nível da quantidade de esfingolípidos complexos com as diferentes fases de crescimento. Na fase estacionária existe apenas um aumento dos lípidos de reserva, havendo um aumento da espessura da parede celular podendo dificultar o processo de extração³². Em seguida as células foram recolhidas e centrifugadas, numa centrífuga Beckman J2-21M/E usando o rotor JA-14, durante 5 min, a 3244 rpm. Depois da primeira centrifugação, o precipitado de células foi lavado duas vezes com água estéril à temperatura ambiente.

Após este procedimento, iniciou-se a extração de lípidos totais das estirpes da levedura *S. cerevisiae* por 4 métodos diferentes: método de Folch *et al.*⁷⁹; uma variante do método de Folch *et al.*⁷⁹; método de Ejsing *et al.*⁸⁰ e de Moehring *et al.*⁸¹.

3.6.1. Método de Folch *et al.* e variante deste método⁷⁹

Depois das centrifugações na centrífuga Beckman, ressuspendeu-se o precipitado de células e transferiu-se para tubos do tipo Falcon de 50 mL, tendo-se feito uma lavagem com água estéril à temperatura ambiente. Para se proceder à extração foram adicionadas esferas de vidro num volume

correspondente ao volume de precipitado (1 g de precipitado corresponde a aproximadamente 1 mL) e adicionou-se um agente redutor, o ditioneitol (DTT) para uma concentração final de 10 mM. Este agente redutor ajuda no rompimento da parede celular através da quebra das ligações persulfureto entre resíduos de cisteínas presentes nas proteínas. Após estes passos foram realizados sete ciclos de agitação no *vórtex* durante 2 min intervalados com 2 min de arrefecimento em gelo. No fim deste procedimento o precipitado é passado para um balão Erlenmeyer.

De seguida adicionou-se vinte vezes o volume de uma mistura de clorofórmio/metanol (2/1 v/v) por volume de precipitado de células. Após esta adição, a suspensão de células foi agitada durante 1h, a 140 rpm e a 20 °C num agitador orbital. Procedeu-se à filtração usando um filtro *Whatman* 1 (para remover células intactas e restos celulares) e adicionou-se uma solução de CaCl₂ 0,04% (v/v) correspondente a 20% do volume total. Após repousar a fase superior, fase aquosa, foi desprezada tendo-se lavado a fase inferior com uma mistura de clorofórmio/metanol/água (3/47/48, v/v/v) num volume correspondente a 20% do volume total. Estes passos foram repetidos até a interface deixar de estar turva. O solvente orgânico foi então evaporado com recurso a um fluxo de azoto, numa hote, e o extrato lipídico foi ressuscitado em clorofórmio/metanol (2/1 v/v).

Aplicou-se o mesmo método, mas sem a adição da solução de CaCl₂ tendo-se adicionado um volume idêntico de água MILLIPORE, sendo aqui designado por variante do método de Folch. A razão desta mudança deve-se ao facto de os esfingolípidos possuírem cargas negativas (IPC e MIPC com uma carga negativa e o M(IP)₂C com duas cargas negativas) podendo ocorrer a formação de complexos entre o cálcio e os esfingolípidos, resultando numa extração menos eficaz.

3.6.2.Método de Ejsing *et al.*⁸⁰

Após as centrifugações, as células foram ressuscitadas no tampão B, tendo-se adicionado posteriormente esferas de vidro num volume correspondente ao volume de precipitado (1 g de precipitado corresponde a aproximadamente 1 mL). De seguida foram realizados 5 ciclos de agitação no *vórtex* durante 2 minutos intercalados com arrefecimento em gelo durante o mesmo tempo. Adicionou-se um volume de clorofórmio/metanol (17/1 v/v) e extraiu-se durante 120 minutos. Recolheu-se a fase orgânica e voltou-se a extrair a fase aquosa com um volume da mistura clorofórmio/metanol (2/1, v/v). Estes dois passos são importantes pois na primeira extração obtêm-se grande parte dos lípidos apolares e na segunda os lípidos polares, dentro dos quais o M(IP)₂C.

Após as extrações juntaram-se as fases orgânicas, tendo-se evaporado os solventes orgânicos num evaporador rotativo BÜCHI R-200. O extrato lipídico foi ressuscitado numa mistura clorofórmio/metanol (2/1, v/v).

3.6.3.Método de Moehring *et al.*⁸¹

Depois das lavagens, adicionou-se tampão C, tendo-se lavado duas vezes as células com este tampão. As células foram ressuscitadas, no mesmo tampão, para uma densidade de 4 A₆₀₀/mL e foram adicionadas esferas de vidro. De seguida foram realizados cinco ciclos de agitação no *vórtex* durante 1 minutos intercalados com arrefecimento em gelo durante o mesmo tempo. De modo a remover as esferas, após a agitação no *vórtex*, centrifugou-se durante 5 minutos, a 4 °C, a 1020 rpm, numa centrífuga eppendorf 5804 R.

Adicionou-se uma mistura de clorofórmio/metanol/água/piridina (60/30/6/1, v/v/v/v) ao lisado de células e extraíram-se os lípidos durante 2h, a 60 °C. De seguida evaporou-se a mistura de solventes

num evaporador rotativo BÜCHI R-200, tendo-se ressuspensionado o extrato lipídico numa mistura clorofórmio/metanol (2/1, v/v).

Nota: a extração de esfingolípídeos neste método pode ser realizada ressuspensionando o extrato em metanol contendo NaOH. A suspensão é agitada durante 2 horas a 30 °C, a 160 rpm, num agitador orbital. De seguida o pH é neutralizado adicionando ácido acético 1 M contendo EDTA 0,5% (m/v). Após esta neutralização é adicionado clorofórmio para induzir a separação por fases, sendo recolhida a fase orgânica. O solvente orgânico é evaporado com recurso a um evaporador rotativo, sendo o extrato lipídico dissolvido em clorofórmio/metanol (2/1, v/v).

3.7. Extração dos esfingolípídeos complexos da levedura

Para a obtenção dos esfingolípídeos complexos partiu-se dos extratos de lípidos totais obtidos através dos métodos anteriormente referidos. Para isso secou-se o extrato inicial de lípidos totais e adicionou-se 20 mL de metilamina (33% em etanol) de modo a submeter os lípidos a uma hidrólise alcalina suave a 55 °C, num condensador de refluxo. Este tratamento hidrolisa as ligações éster (e consequentemente a maioria dos glicerofosfolípídeos), no entanto mantém as ligações amida dos esfingolípídeos intactas permitindo remover os glicerofosfolípídeos dos extratos de lípidos totais⁶¹. De seguida evaporou-se metilamina com recurso a um rotavapor BÜCHI R-200 e o extrato lipídico dissolvido em clorofórmio/metanol (2/1, v/v). Usou-se o método de *Rouser*^{82,83} para dosear o extrato de esfingolípídeos e procedeu-se à separação dos diversos componentes deste extrato através de cromatografia em camada fina (TLC).

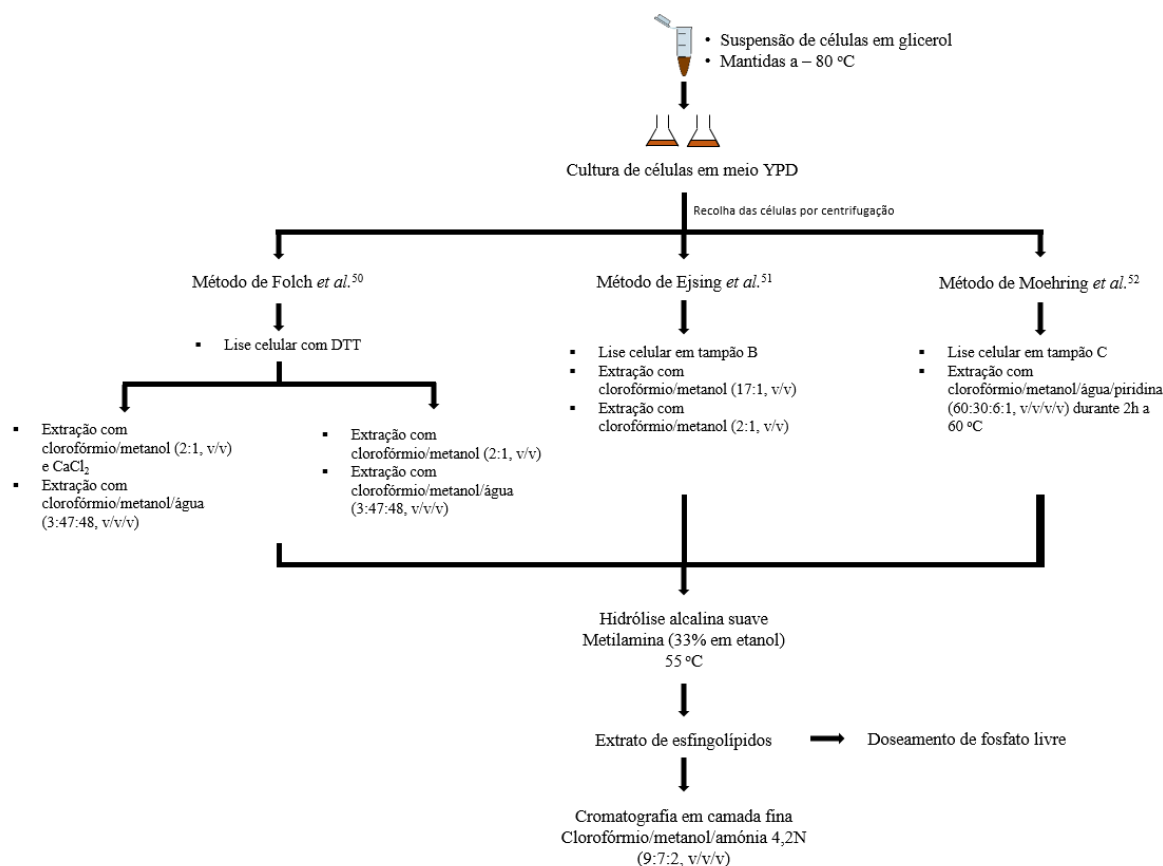


Figura 3.1 – Fluxograma representativo dos diferentes métodos utilizados para a extração de esfingolípídeos.

3.8. Doseamento de fosfolípidos e esfingolípidos

Para se quantificar a quantidade de fosfolípidos e de esfingolípidos presentes nos extratos obtidos para as estirpes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* recorreu-se a uma adaptação do método de Rouser^{82,83}. Neste método realiza-se uma hidrólise ácida a quente dos fosfolípidos tendo-se para isso adicionado ácido perclórico 70% (v/v) e aquecido a 170 °C. Com esta hidrólise o fosfato orgânico livre vai reagir com o molibdato de amónio 1,25 % (m/v) adicionado formando o ácido fosfomolibdico. Com a adição de ácido ascórbico, o ácido fosfomolibdico é reduzido formando um complexo azul. Mediu-se a absorvência a 797 nm, no espectrofotómetro Jasco V-560, de modo a determinar a quantidade relativa do complexo azul formado.

3.9. Doseamento da sonda Di-4-ANEPPS

Determinou-se a concentração de sonda no espectrofotómetro, Jasco V-560, através da medição dos valores de absorvência a 497 nm para a Di-4-ANEPPS. O coeficiente de absorção molar usado foi de 42000 M⁻¹ cm⁻¹ em etanol⁸⁴.

3.10. Espectroscopia de fluorescência

Para a caracterização da membrana da levedura, as células de *S. cerevisiae* foram inoculadas em cerca de 40 mL de meio SC a uma densidade celular de 0,042 A₆₀₀. A cultura foi deixada a crescer a 30 °C a 160 rpm durante 5 horas de modo a que as células se encontrem na fase exponencial. Após as 5 horas foram recolhidos 30 mL de cultura para um tubo estéril e centrifugou-se a 3500 rpm durante 2 minutos, numa centrífuga Eppendorf 5804 R. Desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado duas vezes com água estéril, tendo sido ressuscitado num volume de tampão A para uma concentração final por mL de 0,826 A₆₀₀. Da suspensão de células obtida retirou-se 2 mL tendo-se adicionado a sonda Di-4-ANEPPS para a caracterização da membrana. Para cada ensaio realizou-se também um branco em que se adicionou um volume igual de solvente, em que a sonda se encontrava, à suspensão de células. As suspensões de células, com sonda e sem sonda, foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente (24 °C).

As medidas de espectroscopia de fluorescência foram realizadas num espectralfluorímetro Spex Fluorolog-3 v2.2 da HORIBA Jobin Yvon equipado com monocromadores duplos na excitação e na emissão, em geometria de ângulo reto, polarizadores Glan-Thompson (prismas de calcite, que fornecem uma elevada razão de extinção, necessária na medida de pequenas alterações na anisotropia). A deteção foi efetuada por um tubo fotomultiplicador (PMT) modelo TBX. O espectralfluorímetro possui um sistema de agitação magnética, possibilitando que as medidas de fluorescência fossem realizadas com agitação, evitando a deposição das células. O controlo de temperatura no porta-células foi feita através de um sistema de circulação de água Lauda RM6, sendo que o porta-células está revestido com uma camisa de termostatização.

Nestes estudos de fluorescência foram usadas células de quartzo Suprasil® com dimensões de 0,4 cm por 1 cm da Hellma Analytics, tendo as amostras sido agitadas usando barras magnéticas.

3.10.1. Otimização das condições experimentais para o uso da sonda Di-4-ANEPPS em *S. cerevisiae*

De modo a determinar as condições experimentais ideais para o uso desta sonda nas experiências de fluorescência foram realizados ensaios de intensidade de fluorescência e ensaios de cinética de incorporação desta sonda na membrana plasmática da levedura.

3.10.1.1. Intensidade de fluorescência

Para a determinação da concentração de sonda mais adequada a usar foi realizado um ensaio onde se mediu a intensidade de fluorescência da sonda incorporada na membrana da levedura *S. cerevisiae*. Para isso a suspensão celular foi incubada com quatro concentrações de sonda: 0; 1,0; 1,5 e 2,0 μM . Após a adição de sonda as amostras foram incubadas durante 10 min à temperatura ambiente (24 °C). Foram realizadas sete medições tendo-se feito a média dos valores obtidos para se obter o valor intensidade de fluorescência.

Os brancos foram obtidos da mesma forma tendo-se adicionado etanol espectroscópio, solvente em que se encontra a sonda, em vez de sonda. As medições foram feitas ao comprimento de onda de excitação de 475 nm e ao comprimento de onda emissão de 613 nm e uma largura de banda de 8 nm.

3.10.1.2. Cinética de incorporação da sonda na membrana plasmática da levedura *S. cerevisiae*

De forma a determinar o tempo de incubação mais apropriado foi realizada um ensaio de cinética de incorporação da sonda na membrana. Neste caso só se adicionou a sonda, para uma concentração de 1 μM , à *cuvette* contendo a suspensão de células da levedura no porta-células. Após a adição mediu-se imediatamente a intensidade de fluorescência, tendo-se medido as intensidades de fluorescência em intervalos de 5 segundos até aos 15 minutos.

O ensaio foi conduzido à temperatura ambiente (24 °C) e foi usado 475 nm e 613 nm como comprimento de onda de excitação e de emissão, respetivamente, e uma largura de banda de 8 nm.

3.10.2. Espectroscopia de fluorescência em estado estacionário

As medidas realizadas de fluorescência em estado estacionário foram: espectros de excitação e emissão de fluorescência e anisotropia de fluorescência.

Para a realização destas medidas usou-se uma lâmpada de arco de Xénon de 450 W como fonte de radiação e a referência um fotodíodo.

Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 475 e 613 nm para a sonda Di-4-ANEPPS.

3.10.2.1. Espectros de excitação e emissão de fluorescência

Os espectros de excitação e emissão de fluorescência foram obtidos na ausência de polarizadores utilizando larguras de banda de excitação e emissão de 2 nm, e um tempo de integração de 0,2 s. Estes espectros foram corrigidos com os ficheiros de correção fornecidos pelo fabricante. Obteve-se sempre um espectro para o branco o qual foi subtraído ao espectro da amostra respetiva.

3.10.2.2. Anisotropia de fluorescência

A anisotropia permite detetar possíveis diferenças na ordem e fluidez da membrana, sendo por isso um parâmetro importante para o estudo biofísico das membranas.

No espectralfluorímetro utilizado as medidas de anisotropia de fluorescência foram feitas segundo um formato em L (uma vez que só possui uma única fonte de emissão) usando apenas dois polarizadores Glan-Thomson. Este método requer quatro medições de intensidade individuais: I_{VV} , I_{HV} , I_{VH} , e I_{HH} , onde o primeiro subscrito corresponde à orientação do polarizador de excitação e o segundo a do polarizador de emissão. As letras V e H indicam a orientação vertical e horizontal, respetivamente. A anisotropia de fluorescência ($\langle r \rangle$) foi calculada através da seguinte equação⁷⁰:

$$\langle r \rangle = \frac{I_{VV} - G I_{VH}}{I_{VV} + 2G I_{VH}} \quad \text{Equação 3.3}$$

A letra G designa é um fator de correção do sistema de deteção do instrumento, tendo sido calculado através da razão entre intensidade da componente HH e da componente HV. Este fator é dependente do comprimento de onda de emissão e das fendas usadas.

Antes das medições de anisotropia de fluorescência, os polarizadores de excitação e emissão foram orientados para a posição vertical de modo a selecionar a largura das fendas mais adequada. O critério utilizado é ter um sinal elevado, mas que não ultrapasse a gama de linearidade do detetor ($< 2 \times 10^6$ cps de acordo com as instruções do fabricante). Após selecionada as fendas adequadas, as aquisições foram realizadas num *software* designado CWA (*Constant Wavelength Analysis*).

Por cada amostra foram realizadas sete aquisições, tendo seguido o mesmo procedimento para o branco. O valor do branco foi descontado ao valor da amostra referente.

3.10.3. Espectroscopia de fluorescência em estado transiente

Neste trabalho recorreu-se à fluorimetria de pulso, onde são produzidos pulsos de luz curtos, excitando a amostra, sendo a resposta da fluorescência media em função do tempo. Para este estudo foi necessário usar um controlador de fotão único Fluorohub v2.0 que está acoplado ao espectralfluorímetro, tendo usado o método de cronometragem de fotão único (*Single-Photon Timing*, SPT). Resumidamente este método mede o tempo entre o pulso de excitação e deteção do fotão. Quando a amostra é excitada pelo pulso de excitação, a chegada do primeiro fotão envia um sinal de *Start*. Após cada pulso de luz, apenas um fotão passa por um discriminador de função constante (*constant function discriminator* CFD). Sendo que depois esse sinal passa por um conversor tempo-amplitude (*time-to-amplitude converter* TAC), gerando uma rampa de voltagem que vai aumentando linearmente com o tempo numa escala de nanosegundos. Após um segundo pulso excitar a amostra, o sinal é transmitido para o CFD, enviado um sinal de *Stop* para o TAC parando a rampa de voltagem. O TAC contém a voltagem proporcional à diferença de tempo entre os sinais de excitação e emissão. A voltagem é então amplificada e convertida para um valor numérico pelo conversor analógico-digital (*analog-to-digital converter* ADC). Por fim, este valor numérico é convertido por um analisador de multi-canais (MCA) que pela soma dos vários pulsos constrói um histograma de contagem de fotões em função do tempo⁷⁰.

Os decaimentos de fluorescência podem ser descritos por um somatório de exponenciais, através da seguinte equação:

$$i(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right) \quad \text{Equação 3.4}$$

O tempo de vida médio de fluorescência ($\langle \tau \rangle$) de um fluoróforo com um decaimento complexo é dado pela seguinte equação:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum \alpha_i \tau_i^2}{\sum \alpha_i \tau_i} \quad \text{Equação 3.5}$$

Onde α_i representa a amplitude normalizada (pré-exponencial) e τ_i representa o tempo de vida da componente i do decaimento.

É também possível calcular o tempo de vida médio de fluorescência pesado pelas amplitudes, que é proporcional ao rendimento quântico do fluoróforo.

$$\bar{\tau} = \sum \alpha_i \tau_i \quad \text{Equação 3.6}$$

Os decaimentos de fluorescência das amostras contendo a sonda Di-4-ANEPPS foram obtidas através da excitação da amostra a 460 nm usando um NanoLED-460 (*Light Emitting Diode*) da Horiba Jobin Yvon e a emissão recolhida a 613 nm. Para descrever os decaimentos foram necessárias 3 exponenciais, sendo o número de contagens máximo de 20000 e a escala de tempo utilizada de 0,056 ns/canal.

Os decaimentos de intensidade de fluorescência foram desconvoluídos através de uma suspensão de sílica coloidal (ludox). Assim usando uma solução que dispersa a luz é possível remover a função de resposta instrumental. Na desconvolução usou-se o comprimento de onda no monocromador de emissão correspondente ao comprimento de onda produzida pelo NanoLED, tendo-se acumulado um valor máximo de 50000 contagens.

Para a análise dos decaimentos da intensidade de fluorescência recorreu-se a um *software* chamado TRFA (*Time-Resolved Fluorescence Analysis*). O ajuste dos parâmetros aos decaimentos experimentais foi feito utilizando um método de convolução iterativo de mínimos quadrados não linear baseado no algoritmo de Marquardt⁸⁵.

3.11. Análise da composição dos extratos de lípidos totais e de esfingolípidos por cromatografia em camada fina

Para a análise dos diferentes extratos obtidos pelos métodos anteriormente referidos recorreu-se à cromatografia em camada fina (*thin layer chromatography* TLC). Esta técnica consiste na separação de misturas não voláteis formando bandas ao longo de um adsorvente (fase estacionária).

Nas TLC realizadas usou-se como adsorvente sílica-gel, um adsorvente bastante polar, pelo que os lípidos polares ficam mais fortemente adsorvidos à sílica que os lípidos não polares. Consequentemente os lípidos polares terão uma taxa de migração mais baixa comparativamente aos lípidos não polares⁸⁶. Utilizaram-se dois sistemas de solventes, sendo o solvente 1 [clorofórmio/metanol/água (65/25/4, v/v/v)] para a separação dos glicerofosfolípidos e o solvente 2 [clorofórmio/metanol/amónia 4,2N (9/7/2, v/v/v)] para a separação dos esfingolípidos. Estes sistemas de solventes foram escolhidos por estarem descritos na literatura sendo aqueles com os quais se obtém uma melhor separação⁸⁷.

Começou-se por ativar a placa de sílica gel 20 x 20 cm² numa estufa a 100 °C durante 1 hora. Após a placa arrefecer foram aplicados cerca de 50 µg para a TLC de glicerofosfolípidos e 200 µg para a TLC de esfingolípidos. A placa foi colocada numa câmara de TLC previamente saturada com o sistema de solventes a usar, tendo-se deixado que o sistema de solventes ascendesse até 1 cm do topo da placa. Na revelação das bandas foi usado um método não destrutivo (reversível), exposição a vapores de iodo, e três métodos destrutivos, solução de ácido fosfomolibdico a 5 % em etanol (m/v), solução de orcinol a 5 % em ácido sulfúrico e abrasamento (“charring”) com ácido sulfúrico. A ordem de aplicação destes reagentes foi testada de modo a se observar qual a melhor para a visualização das bandas. O iodo por ser uma marcação reversível deve ser sempre o primeiro seguido dos outros reveladores. O principal problema reside no fato do abrasamento ser um revelador universal pelo que vai marcar todos os compostos que se encontram na placa, sendo pouco confiável a sua aplicação após a pulverização da placa com os outros reveladores. Assim, o esquema usado foi a revelação com iodo, orcinol (uma vez que vai marcar apenas os resíduos de manose presentes nos esfingolípidos) e por fim o ácido fosfomolibdico. O abrasamento fez-se sempre após a revelação com o iodo.

Na revelação com vapor de iodo a placa, após estar seca, é colocada numa câmara saturada com cristais de iodo sendo que após alguns minutos começam a aparecer bandas com uma coloração amarela. Este método marca essencialmente lípidos contendo insaturações podendo, no entanto, marcar lípidos que não possuam insaturações apresentando uma cor castanha (em vez do amarelo), especialmente lípidos que contenham na sua constituição azoto⁸⁶. Para a revelação com orcinol a placa é vaporizada com esta solução tendo que ser aquecida a 100 °C durante 5 a 15 minutos levando ao aparecimento de uma banda roxa na presença de manose⁸⁸, que se encontra apenas nos esfingolípidos da levedura.

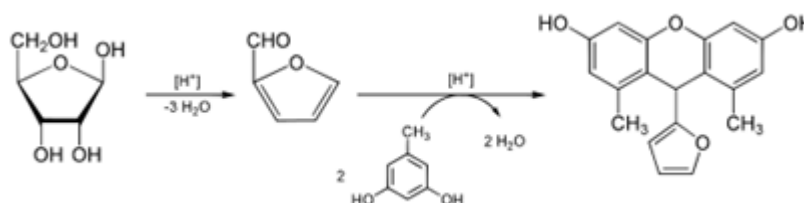


Figura 3.2 – Esquema da reação do orcinol com uma pentose⁸⁹.

Nas cromatografias realizadas a identificação das bandas foi feita por comparação com os seguintes padrões: POPC, liso-PC, PE, PI, PS e ergosterol. sendo que o liso-PC foi apenas aplicado na TLC usada para os esfingolípidos e o PE, PI e PS na TLC para a separação de glicerofosfolípidos. Os volumes aplicados de cada padrão foram: 10 µL de POPC, a uma concentração de 1 mg/mL; 15 µL de liso-PC a 1 mg/mL; 20 µL de PE a 2 mg/mL; 40 µL de PI a 1 mg/mL; e 20 µL de ergosterol a 1 mg/mL.

3.12. Análise estatística

Os dados estão apresentados como a média \pm desvio padrão de, pelo menos, três ensaios independentes. A análise estatística dos dados experimentais foi feita com base no teste *t-Student* de duas caudas por comparação de dois grupos de resultados diferentes. As diferenças foram consideradas significativas a partir de um valor de significância $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Estudo do crescimento celular em *S. cerevisiae*

Como referido na secção de Introdução, o lipidoma da levedura pode variar com o estado de crescimento em que a levedura se encontra pelo que este estudo é importante para observar se existem algumas diferenças no crescimento das duas estirpes. Os resultados estão representados na figura 4.1.

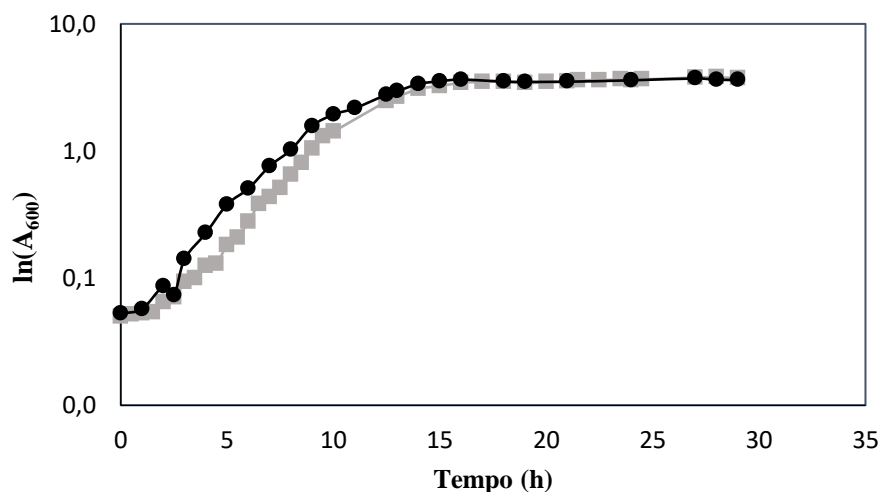


Figura 4.1 – Curvas de crescimento das estirpes *csg2Δcsg1Δ* a cinzento e *csg1Δcsh1Δ* a preto, em meio SC. As células foram inoculadas para uma concentração celular de 0,05 A_{600} ($1 A_{600} \approx 2,94 \times 10^7$ células/mL) e foram deixadas a crescer a 30 °C com agitação a 160 rpm. O crescimento foi seguido através da medição a 600 nm durante intervalos curtos de tempo.

Pode-se observar que ambas as estirpes apresentam um perfil de crescimento semelhante, podendo ser comprovado pelos parâmetros de crescimento celular, taxa de crescimento (μ) e tempo de geração ou duplicação (t_g) calculados (Quadro 4.1).

Quadro 4.1 – Parâmetros do crescimento celular calculados a partir da fase exponencial de crescimento das estirpes *csg2Δcsg1Δ* e *csg1Δcsh1Δ*. Os valores correspondem à média \pm desvio padrão de 6 replicados independentes. Os valores da estirpe *wt* e da estirpe *ipt1Δ* foram retirados de [7]

	μ (h ⁻¹)	t_g (h)
<i>wt</i>	$0,42 \pm 0,01$	$1,67 \pm 0,02$
<i>ipt1Δ</i>	$0,40 \pm 0,02$	$1,74 \pm 0,01$
<i>csg2Δcsg1Δ</i>	$0,40 \pm 0,02$	$1,75 \pm 0,07$
<i>csg1Δcsh1Δ</i>	$0,39 \pm 0,01$	$1,76 \pm 0,05$

Como se pode observar os parâmetros calculados são semelhantes indicando que o crescimento destas duas estirpes é idêntico. Comparando estes resultados com os obtidos para a estirpe *wt* e *ipt1Δ*⁷ observa-se que a mutação não afeta o crescimento celular desta levedura, sendo os parâmetros bastante idênticos.

4.2. Estudo biofísico da membrana plasmática da levedura *S. cerevisiae* com a sonda Di-4-ANEPPS

Como foi referido anteriormente na secção 1.3.2 o principal esfingolípido presente na membrana plasmática da levedura *S. cerevisiae* é o $M(IP)_2C$. A deleção do gene *ipt1* induz uma alteração na síntese de esfingolípidos impedindo a formação deste esfingolípido, havendo uma acumulação do esfingolípido anterior, o MIPC. Assim de modo de perceber o efeito da ausência do esfingolípido complexo $M(IP)_2C$ na organização da membrana plasmática, marcaram-se células intactas das duas estirpes, *wt* e *ipt1Δ* com a sonda Di-4-ANEPPS.

Já foram realizados estudos⁷ usando estas estirpes de levedura tendo para isso sido utilizadas outras sondas, nomeadamente a sonda *t*-PnA (ácido *trans*-parinário) e o DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno), tendo-se observado que existe um aumento da ordem global na ausência do $M(IP)_2C$. Nos estudos realizados por Bastos *et al.*⁶⁹ usou-se a sonda di-4-ANEPPS para perceber a potencialidade desta sonda para o estudo de domínios ricos em ergosterol, sendo análogos desta sonda já usados anteriormente para o estudo de domínios ricos em colesterol^{90,91}. Os resultados do trabalho realizado por Bastos *et al.* mostraram que a sonda di-4-ANEPPS tem preferência para os domínios l_o , mostrando também uma sensibilidade à presença e níveis de ergosterol traduzida quer num desvio no espectro de emissão para o azul quer em tempos de vida de fluorescência mais longos. Assim, esta sonda pode ser utilizada para estudos da membrana plasmática da levedura *S. cerevisiae*, como o caso do presente trabalho, em que se compara a estirpe *wt* com a estirpe mutante *ipt1Δ*.

Os resultados que serão apresentados ao longo deste trabalho representam a média de três replicados biológicos independentes.

4.2.1. Otimização das condições experimentais para a sonda Di-4-ANEPPS em suspensões celulares

Para a determinação da concentração mais adequada de Di-4-ANEPPS, mediu-se a intensidade da fluorescência em concentrações crescentes (0-2 μM) de sonda numa suspensão de células de *S. cerevisiae*.

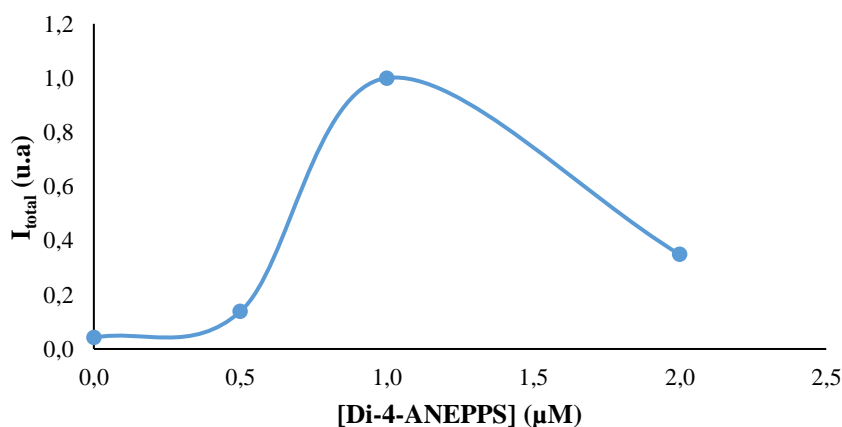


Figura 4.2 – Otimização da concentração de sonda di-4-ANEPPS a utilizar na marcação da membrana plasmática numa suspensão de células da estirpe *wt* da levedura *S. cerevisiae*. As amostras apresentavam uma concentração celular correspondente a $0,826 A_{600}$ tendo sido incubadas à temperatura ambiente (24 °C). O comprimento de onda de excitação usado foi de 475 nm e o comprimento de onda emissão usado foi de 613 nm.

Pode-se observar um claro aumento da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de sonda até 1 μM , que se deve ao aumento do número de moléculas fluorescentes (aumento da concentração de sonda). A partir desta concentração de sonda verificou-se uma diminuição da intensidade de fluorescência. Esta diminuição observada para o valor de 2 μM pode estar relacionada com: i) perturbações da estabilidade da membrana devido ao aumento do volume de etanol (solvente em que a sonda se encontra, 0,3% (v/v) para 0,5 μM ; 0,6% (v/v) para 1 μM ; 1% (v/v) para 2 μM); ii) possível saturação da membrana com a sonda e consequente agregação e/ou internalização; iii) auto-extinção de fluorescência (*self-quenching*).

Da passagem de 0,5 para 1,0 μM observa-se um grande aumento da intensidade de fluorescência. Isto deve-se ao facto de sonda se poder encontrar em duas formas, em monómero e agregada. Quando se encontra na forma de monómero a sonda tem pouca afinidade para a membrana pelo que a sua intensidade de fluorescência é baixa, ao passo que quando na forma de agregado possui uma grande afinidade⁹¹, ocorrendo um aumento supra-linear da intensidade de fluorescência. Assim, pode-se estar a dar a passagem de monómero para uma forma de agregado entre aquelas duas concentrações, explicando assim o aumento acentuado de fluorescência.

Para o estudo do tempo mais adequado de incorporação da sonda Di-4-ANEPPS, realizou-se um ensaio cinético no qual se mediu a intensidade de fluorescência desta sonda numa suspensão de células ao longo do tempo. Neste ensaio cinético a usou-se uma concentração de sonda de 1 μM com base nos resultados obtidos anteriormente.

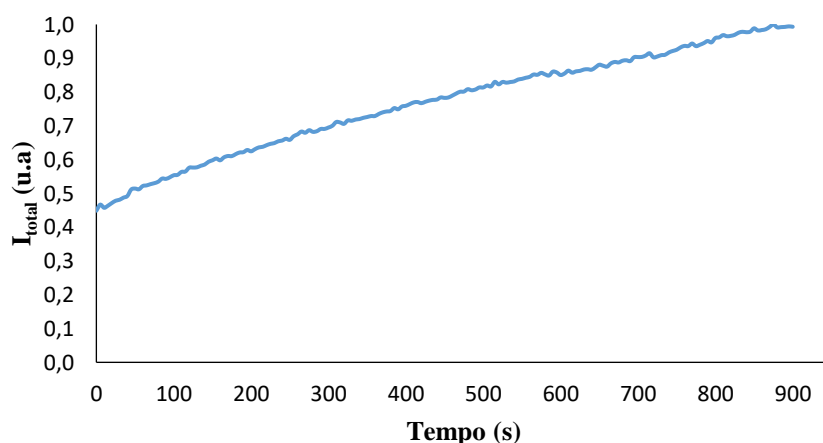


Figura 4.3 – Estudo da cinética de incorporação da sonda di-4-ANEPPS numa suspensão de células da estirpe *wt* de *S. cerevisiae*. As amostras apresentavam uma concentração celular correspondente a 0,826 A_{600} tendo sido incubadas à temperatura ambiente (24 °C). O comprimento de onda de excitação usado foi de 475 nm e o comprimento de onda emissão usado foi de 613 nm.

Observa-se que existe um aumento da intensidade de fluorescência ao longo do tempo o que corresponde à incorporação da sonda na membrana. Apesar de se continuar a observar um aumento da intensidade de fluorescência usou-se como tempo mais adequado para a incubação da sonda os 10 min. Isto porque com este tempo de incubação obtém-se uma marcação estável com uma intensidade próxima da intensidade máxima. Foi também escolhido para o número de fotões por segundo ser idêntico ao de estudos anteriores, permitindo fazer uma comparação mais realista, para uma menor marcação das membranas internas e para usar o tempo de marcação ótimo em *Neurospora crassa*, um outro fungo que está a ser estudado no laboratório e que cujas propriedades biofísicas se pretendeu comparar com as de *S. cerevisiae*⁹².

4.2.2. Espectros de emissão e excitação da sonda Di-4-ANEPPS

Na figura 4.3 estão representados os espectros de excitação e emissão da sonda Di-4-ANEPPS, para uma concentração de 1 μM , na membrana plasmática das duas estirpes da levedura *S. cerevisiae*.

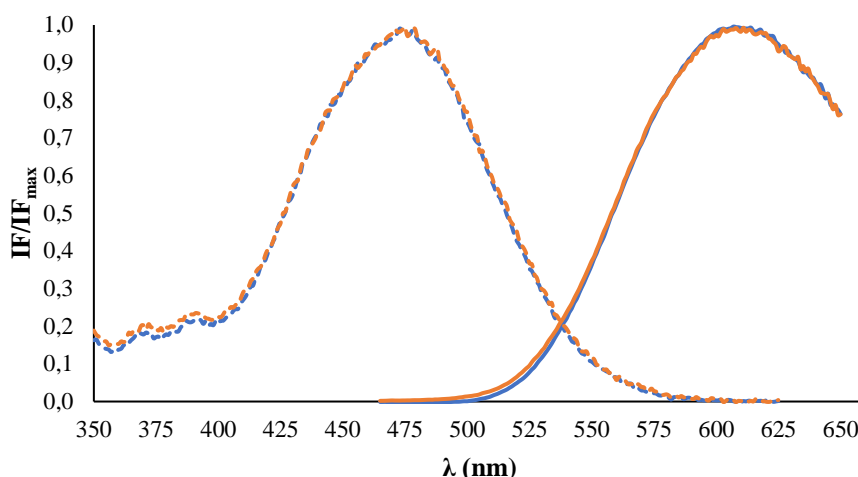


Figura 4.4 – Espectros de excitação (– –) e emissão (–) normalizados da sonda (1 μM) incorporada na membrana plasmática das estirpes *wt* (azul) e *ipt1Δ* (laranja) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As amostras apresentavam uma concentração celular de 0,826 A_{600} . A excitação foi feita aos 450 nm e a emissão foi detetada aos 635 nm.

Em relação ao espectro de excitação pode-se observar um pico a 475 nm, não se observando quaisquer diferenças entre o espectro obtido para a estirpe *wt* como para a estirpe *ipt1Δ*. Do espectro de emissão retiram-se as mesmas conclusões tendo-se observado um pico aos 613 nm.

Realizou-se o mesmo estudo, mas com uma concentração de sonda maior (2 μM) de modo a averiguar se os fatores referidos na secção 4.1.1 poderiam estar a afetar os parâmetros pretendidos.

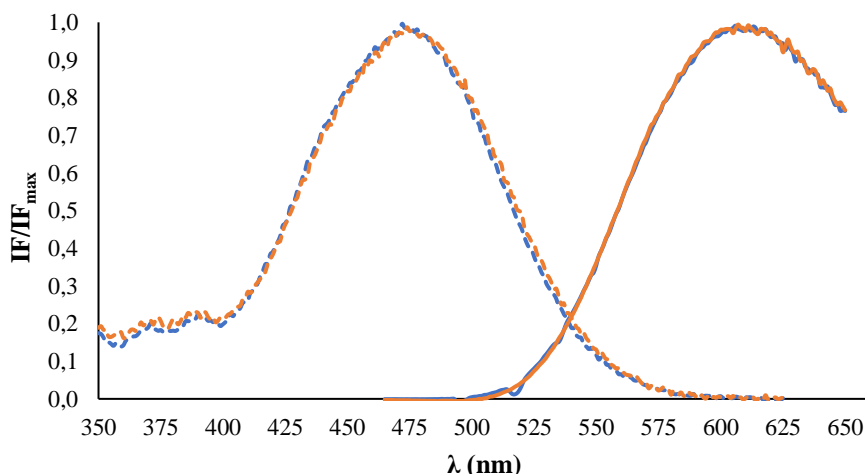


Figura 4.5 – Espectros de excitação (– –) e emissão (–) normalizados da sonda (2 μM) incorporada na membrana plasmática das estirpes *wt* (azul) e *ipt1Δ* (laranja) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As amostras apresentavam uma concentração celular de 0,826 A_{600} . A excitação foi feita aos 450 nm e a emissão foi detetada aos 635 nm.

Identicamente ao que se observou anteriormente, os espectros da sonda na presença de células das duas estirpes são bastante semelhantes entre si. Registou-se um pico aos 475 nm, respetivo ao espectro de excitação, e um pico aos 613 nm, respetivo ao espectro de emissão.

4.2.3. Anisotropia de fluorescência

Através das medidas de anisotropia é possível obter-se uma noção da “microviscosidade” do microambiente em que a sonda Di-4-ANEPPS está inserida. Uma vez que esta sonda tem uma partição preferencial para domínios l_o , será expectável que o valor de anisotropia seja elevado para a estirpe *wt*, visto que esta possui estes domínios e estes domínios têm uma elevada ordem.

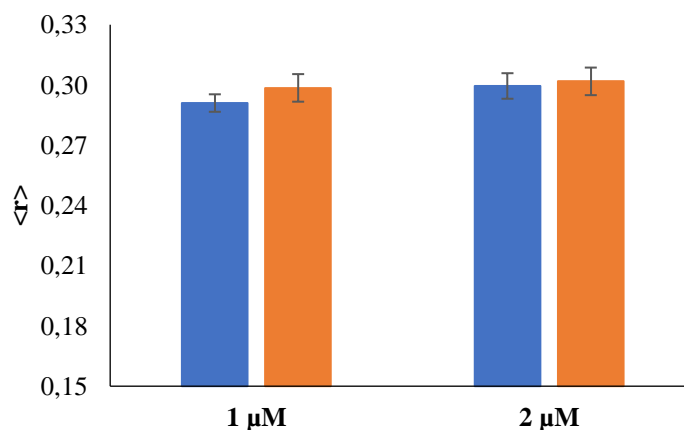


Figura 4.6 – Anisotropia de fluorescência da Di-4-ANEPPS na membrana plasmática de células da estirpe *wt* (azul) e *ipt1Δ* (laranja). Ambas as amostras apresentavam uma concentração celular de 0,826 A₆₀₀. As amostras foram incubadas à 24 °C bem como a realização dos ensaios. As amostras foram excitadas a 475 nm e a fluorescência medida a 613 nm.

A estirpe *wt* apresenta um valor de anisotropia de $0,291 \pm 0,004$ para 1 μM de sonda e $0,295 \pm 0,009$ para 2 μM enquanto a estirpe *ipt1Δ* apresenta um valor de anisotropia de $0,298 \pm 0,007$ para 1 μM de sonda e $0,301 \pm 0,005$ para 2 μM. Estes valores de anisotropia indicam-nos que a sonda se encontra num microambiente com um grau de rigidez elevado, tendo uma baixa difusão rotacional, mostrando que a sonda está inserida nos domínios l_o . No entanto, após análise estatística com o teste *t-Student*, não existe uma diferença significativa entre os valores obtidos para as duas estirpes, o que pode indicar que a ausência do esfingolípido mais complexo, o M(IP)₂C, não influencia a formação de domínios l_o . É de notar, no entanto, que há uma ligeira tendência para valores maiores no caso da estirpe *ipt1Δ*, para ambas as concentrações de sonda. Na secção de Discussão esta observação será retomada.

No entanto só estes dados não fornecem uma base sólida para confirmar essa interpretação, tendo-se por isso realizado outros ensaios experimentais.

4.2.4. Decaimentos da intensidade de fluorescência

Através da fluorimetria resolvida no tempo, como os decaimentos da intensidade de fluorescência, é possível obter informação sobre o ambiente em que a sonda está inserida, tendo-se realizado estes ensaios com o intuito de observar diferenças entre as duas membranas.

Na figura 4.6 estão representados os dados experimentais referentes aos decaimentos da intensidade de fluorescência, resíduos e autocorrelação do ajuste como função descrita por três exponenciais da sonda Di-4-ANEPPS na membrana plasmática das duas estirpes em estudo.

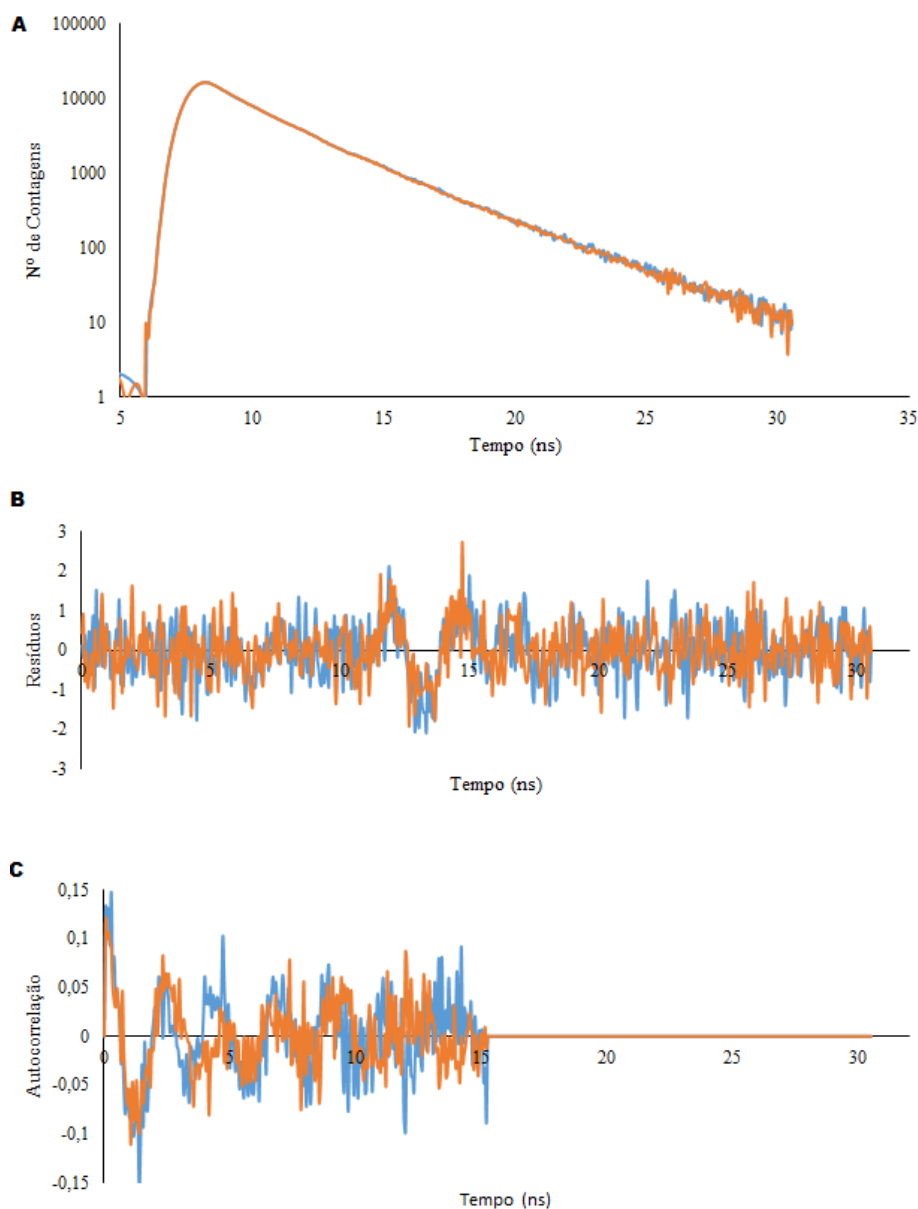


Figura 4.7 – Decaimentos de intensidade de fluorescência da Di-4-ANEPPS na membrana plasmática da levedura (A), resíduos (B) e autocorrelação dos resíduos (C) resultantes do ajuste duma função multiexponencial. A azul está representada a estirpe *wt* e a laranja a estirpe *ipt1Δ*. As amostras tinham uma densidade celular de 0.826 A₆₀₀/mL, tendo-se incubado as amostras e realizado o ensaio a 24 °C. Usou-se uma concentração de sonda de 1 μM.

Pode-se observar que não existem diferenças aparentes entre os decaimentos obtidos para as duas estirpes, tendo estes resultados sido idênticos aos obtidos para uma concentração de sonda de 2 μM (Quadro 4.2). Os decaimentos da intensidade de fluorescência do Di-4-ANEPPS na membrana plasmática foram descritos por três exponenciais. A partir da análise dos decaimentos foram obtidos diversos parâmetros fotofísicos nomeadamente pré-exponenciais e os tempos de vida das diferentes componentes (tempos médios de vida, tempos de vida médios pesados pelas amplitudes).

Quadro 4.2 – Parâmetros que descrevem os decaimentos de intensidade de fluorescência da sonda Di-4-ANEPPS na membrana plasmática da levedura *S. cerevisiae*. Ambas as estirpes apresentavam uma densidade celular de 0.826 A₆₀₀ tendo-se incubado as amostras a 24 °C e realizado os ensaios à mesma temperatura. α , corresponde às pré-exponenciais dos componentes i do decaimento, τ_i . O $\langle\tau\rangle$ corresponde ao tempo de vida médio de fluorescência e τ_{avg} corresponde ao tempo de vida médio pesado pelas amplitudes.

[Di-4-ANEPPS]		1 μ M		2 μ M	
Estirpe		<i>wt</i>	<i>ipt1</i> Δ	<i>wt</i>	<i>ipt1</i> Δ
Parâmetros de análise dos decaimentos	α_1	0,31 \pm 0,05	0,23 \pm 0,11	0,29 \pm 0,01	0,30 \pm 0,06
	τ_1 (ns)	0,46 \pm 0,13	0,53 \pm 0,16	0,54 \pm 0,25	0,38 \pm 0,03
	α_2	0,51 \pm 0,08	0,54 \pm 0,01	0,53 \pm 0,07	0,52 \pm 0,05
	τ_2 (ns)	2,13 \pm 0,19	2,03 \pm 0,17	2,13 \pm 0,20	2,09 \pm 0,13
	α_3	0,18 \pm 0,06	0,23 \pm 0,10	0,18 \pm 0,06	0,19 \pm 0,02
	τ_3 (ns)	3,71 \pm 0,38	3,59 \pm 0,28	3,83 \pm 0,34	3,77 \pm 0,31
	f_1	0,07 \pm 0,01	0,05 \pm 0,02	0,08 \pm 0,03	0,06 \pm 0,01
	f_2	0,57 \pm 0,10	0,55 \pm 0,08	0,57 \pm 0,09	0,57 \pm 0,02
	f_3	0,35 \pm 0,10	0,40 \pm 0,10	0,35 \pm 0,12	0,37 \pm 0,02
	$\langle\tau\rangle$ (ns)	2,55 \pm 0,06	2,56 \pm 0,08	2,60 \pm 0,16	2,60 \pm 0,15
	τ_{avg} (ns)	1,88 \pm 0,18	2,02 \pm 0,20	1,98 \pm 0,16	1,88 \pm 0,09

A partir dos resultados apresentados no quadro anterior é possível confirmar de forma quantitativa que não existem diferenças significativas entre as propriedades biofísicas da membrana plasmática das estirpes *wt* e *ipt1* Δ , que são reportadas pelos decaimentos de intensidade de fluorescência da sonda Di-4-ANEPPS. Estes resultados poderiam indicar que a ausência de M(IP)₂C não afetaria a presença dos domínios lona membrana plasmática. Os valores obtidos são idênticos aos anteriormente determinados⁶⁹ em sistemas modelos na fase l_o contendo ergosterol e POPC. Os resultados obtidos por espectroscopia de fluorescência levam-nos a depreender que a ausência de M(IP)₂C não afeta a presença de domínios l_o, no entanto estudos anteriores⁷ sugerem que este esfingolípido está envolvido na formação destes domínios em *S. cerevisiae*, assunto que será retomado na secção de Discussão.

4.3. Análise dos extratos de lípidos totais

Apesar não se ter detetado diferenças significativas nas propriedades biofísicas da membrana plasmática das estirpes *wt* e *ipt1* Δ , os extratos de lípidos totais das duas estirpes foram comparados, por cromatografia em camada fina. O intuito foi averiguar as diferenças nas composições em glicerofosfolípidos e esfingolípidos.

Quanto à composição em glicerofosfolípidos pode-se observar que ambas as estirpes apresentam uma composição idêntica. O PI teve uma migração anormal tendo originado duas bandas com uma grande migração. Isto pode ser devido à degradação deste fosfolípido dando origem ao liso-PI e a cadeias acilo livres. Esta interpretação pode ser sustentada com o facto de uma das bandas do PI ter uma migração semelhante aos dos ácidos gordos (por comparação com o resultado obtido por Schneider e Daum) que corresponderá à cadeia acilo livre.

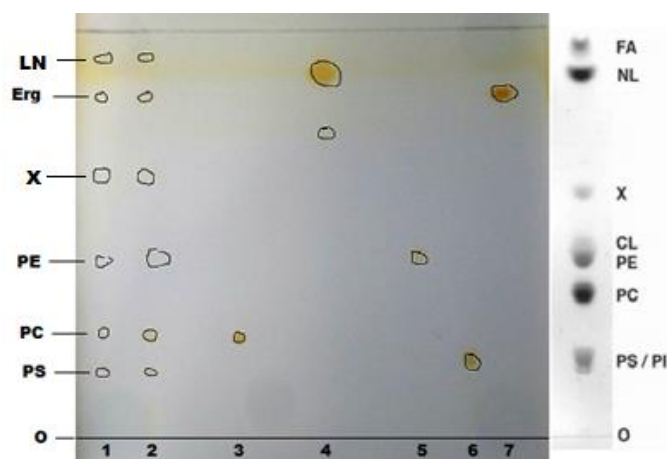


Figura 4.8 – Análise da composição em glicerofosfolípidos dos extratos de lípidos totais da levedura *S. cerevisiae* obtidos pelo método de Folch *et al.* das estirpes *wt* e *ipt1Δ*. Usaram-se placas de sílica-gel e o sistema de solventes 1. **1** – Extrato de lípidos totais da estirpe *wt*; **2** – Extrato de lípidos totais da estirpe *ipt1Δ*; **3** – POPC; **4** – PI; **5** – PE; **6** – PS; **7** – Ergosterol. Do lado direito da placa encontra-se a separação dos glicerofosfolípidos usando o mesmo sistema de solventes por Schneiter e Daum⁹³. FA – Ácido gordo; NL – Lípidos neutros; CL – Cardiolipina; O – Origem. A revelação da placa da esquerda foi feita com vapor de iodo enquanto a da direita foi abrasamento com ácido sulfúrico.

A identificação das bandas obtidas foi feita por comparação com as bandas dos padrões aplicados, tendo-se calculado os fatores de retenção de cada banda obtida tanto para as amostras como para os padrões. No quadro 4.2 compararam-se estes valores com os obtidos por Schneiter e Daum.

Quadro 4.3 – Fatores de retenção das diversas bandas obtidas na cromatografia em camada fina apresentada na figura 4.7

	R_F			
	<i>wt</i>	<i>ipt1Δ</i>	Padrões	Schneiter e Daum ⁹³
PI	-	-	-	0,18
PS	0,15	0,15	0,18	0,18
PC	0,25	0,25	0,25	0,35
PE	0,43	0,43	0,42	0,44
X	0,63	0,63	-	0,60
Ergosterol	0,83	0,83	0,85	-
LN	0,93	0,93	-	0,89

Pode-se observar que o lípido X se encontra mais ou menos à mesma distância da origem em ambas as estirpes (R_F de 0,63 para a estirpe *wt* e *ipt1Δ*) e para a TLC obtida por Schneiter e Daum⁹³. Os lípidos neutros serão essencialmente ésteres de ergosterol, devido ao método de extração, enquanto o lípido X será referente a cerebrosídeos (extrato de lípidos do córtex cerebral analisados com o mesmo sistema de solventes)⁹⁴. Uma vez que as leveduras não possuem cerebrosídeos, os compostos mais semelhantes serão a IPC ou a fitoceramida.

4.4. Otimização das condições experimentais para a análise de esfingolípidos por cromatografia em camada fina

Um dos objetivos deste trabalho passava pela extração dos lípidos totais da levedura *S. cerevisiae* e posterior extração e purificação dos esfingolípidos complexos, sendo estes analisados por cromatografia em camada fina.

Um dos principais passos para a obtenção dos esfingolípidos é a hidrólise dos glicerofosfolípidos realizada por hidrólise alcalina suave com metilamina. Assim é necessário controlar o tempo desta hidrólise de modo a obter os esfingolípidos com a menor quantidade possível de outros lípidos. No entanto, deve-se ter em consideração que tempos curtos podem hidrolisar parcialmente os glicerofosfolípidos obtendo-se lisofosfolípidos (pode ocorrer a remoção de apenas uma das cadeias acilo) e que tempos longos podem hidrolisar completamente os glicerofosfolípidos bem como os esfingolípidos, o que não é pretendido. Em estudos já realizados com a estirpe *wt* da levedura *S. cerevisiae* usam-se tempos de hidrólise entre os 60 e os 120 minutos^{49,81}. Inicialmente começou-se por fazer a hidrólise de um glicerofosfolípido, POPC, de modo a perceber qual o tempo mais adequado para que este fosse totalmente hidrolisado. No entanto a hidrólise de um glicerofosfolípido numa mistura de apenas POPC pode não ser idêntica à hidrólise na presença de outros lípidos nomeadamente esfingolípidos e esteróis, que estão muito representados na membrana plasmática da levedura.

Assim de modo a determinar o tempo de hidrólise mais adequado para a extração dos esfingolípidos, preparou-se uma mistura modelo contendo POPC, SM e Colesterol numa proporção molar de 1/1/1. Estes lípidos foram escolhidos de modo a mimetizar as proporções aproximadas destas classes de lípidos na membrana plasmática de eucariotas nomeadamente da levedura (um glicerofosfolípido, um esfingolípido e um esteroide). Tanto esta mistura como o POPC foram sujeitos a uma hidrólise alcalina suave com metilamina com diferentes tempos. Na figura 4.8 estão representados os resultados deste estudo obtidos por cromatografia em camada fina.

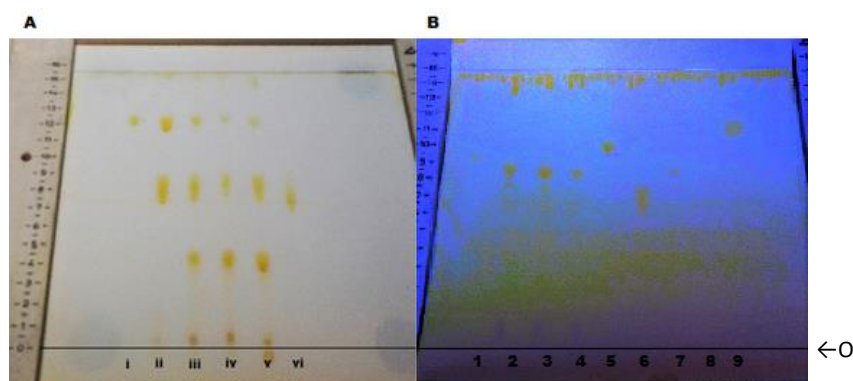


Figura 4.9 – Análise da hidrólise do POPC (A) e da mistura de POPC/SM/Colesterol (1/1/1) (B). Usaram-se placas de sílica-gel e o sistema de solventes 2. **i** – POPC; **ii** – Hidrólise durante 30 min; **iii** – Hidrólise durante 1h; **iv** – Hidrólise durante 1h e 30 min; **v** – Hidrólise durante 2h; **vi** – Liso-fosfatidilcolina (Liso-PC); **1** – Mistura sem hidrólise; **2** – Hidrólise durante 3h; **3** – Hidrólise durante 4h; **4** – Hidrólise durante 24h; **5** – POPC; **6** – Liso-fosfatidilcolina; **7** – Esfingomielina; **8** – Colesterol; **9** – Ácidos gordos; **O** – Origem. A revelação da placa foi feita com vapor de iodo.

Pode-se observar na placa A que maiores tempos de hidrólise levam a uma diminuição da banda correspondente ao POPC e equivalente aumento da banda do liso-PC. Este resultado era expectável uma vez que a hidrólise leva à degradação do POPC, havendo a remoção das suas cadeias acilo. Através dos resultados apresentados na placa A pode-se concluir que o tempo de hidrólise não é suficiente para a total degradação do POPC pelo que será necessário uma hidrólise mais prolongada.

Na placa B não é visível a banda correspondente ao POPC em nenhuma das amostras sujeitas a hidrólise (poço 2, 3 e 4) pelo que 3h será suficiente para hidrolisar o POPC. No entanto, para as bandas 2 e 3 é possível observar que ainda existe liso-PC (banda que se encontra abaixo da esfingomielina) pelo que uma hidrólise de 4h não será suficiente para se obter apenas os esfingolípidos. É de notar também que existe uma diminuição da esfingomielina entre a hidrólise de 4h e a de 24h, que será de evitar visto que é a classe de lípidos que se pretende obter.

Tendo em conta os resultados obtidos anteriormente realizaram-se hidrólises durante 4h, 6h e 8h, estando os resultados apresentados na figura 4.10.

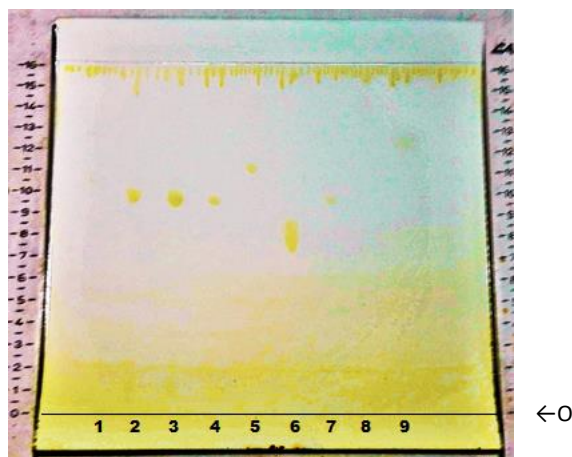


Figura 4.10 – Análise da hidrólise da mistura de POPC/SM/Colesterol (1/1/1). Usaram-se placas de sílica-gel e o sistema de solventes 2. **1** – Mistura sem hidrólise; **2** – Hidrólise durante 6h; **3** – Hidrólise durante 8h; **4** – Hidrólise durante 24h; **5** – POPC; **6** – Liso-fosfatidilcolina; **7** – Esfingomielina; **8** – Colesterol; **9** – Ácidos gordos; **O** – Origem. A revelação da placa foi feita com vapor de iodo.

Para as amostras sujeitas a hidrólise (banda 2, 3 e 4), não se observam as bandas correspondentes ao POPC e liso-PC. É de referir também que a banda correspondente à esfingomielina sofre uma diminuição apenas entre as 8h e as 24h. Assim, através dos resultados obtidos nas três placas apresentadas pode-se concluir que o tempo mais adequado para a hidrólise dos glicerofosfolípidos e posterior obtenção dos esfingolípídeos é de 6h ou 8h. Isto porque não observam as bandas correspondentes ao POPC nem ao liso-PC e a banda da esfingomielina não sofre alteração (não existe degradação do esfingolípido ou esta é muito reduzida).

4.5. Análise dos extratos de esfingolípídeos

Após a otimização do processo de obtenção dos esfingolípídeos, usaram-se extratos das duas estirpes de levedura *S. cerevisiae*. Estes extratos foram sujeitos, tal como anteriormente, a uma hidrólise alcalina suave com metilamina durante 6h e 8h, estando os resultados representados na figura 4.10.

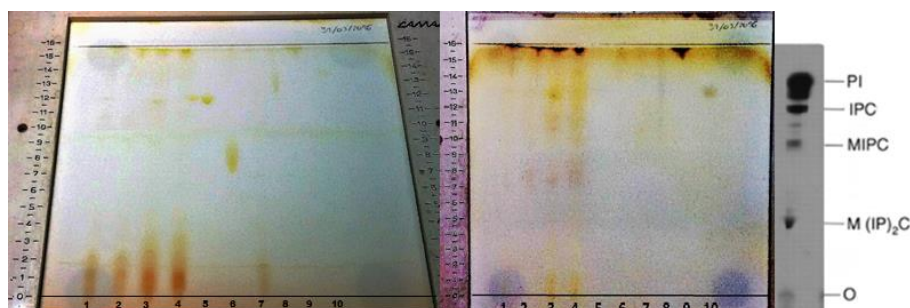


Figura 4.11 – Análise da hidrólise dos extratos de esfingolípídeos obtidos pelo método de Folch *et al.* das duas estirpes de levedura *S. cerevisiae*. Usaram-se placas de sílica-gel e o sistema de solventes 2. **1** – Extrato de esfingolípídeos de células *wt* com 6h de hidrólise; **2** – Extrato de esfingolípídeos de células *wt* com 8h de hidrólise; **3** – Extrato de esfingolípídeos de células *ipt1Δ* com 6h de hidrólise; **4** – Extrato de esfingolípídeos de células *ipt1Δ* com 8h de hidrólise; **5** – POPC; **6** – Liso-PC; **7** – PE; **8** – Éster de colesterol; **9** – Ergosterol; **10** – Ácido gordo. **O** – Origem de aplicação. Os esfingolípídeos foram detetados com vapor de iodo (A) e com orcinol (B). Está também representada a separação de esfingolípídeos usando o mesmo sistema de solvente realizada por Nakase *et al.*⁸⁷ (C).

Na revelação com vapor iodo há a marcação de lípidos contendo insaturações e dado que os esfingolípídeos presentes na membrana plasmática da levedura não contêm insaturações é esperado que não haja marcação dos esfingolípídeo. No entanto o iodo pode também marcar lípidos que não possuam insaturações apresentando uma cor castanha (em vez do amarelo), especialmente lípidos que contenham na sua constituição azoto⁸⁶. Apesar disso, para a identificação de esfingolípídeos a revelação com orcinol é a mais adequada uma vez que marca glicolípídeos. Neste caso vai marcar a manose que, em leveduras, apenas se encontra nos esfingolípídeos M(IP)₂C e MIPC.

Como se pode observar pela placa B, existe a marcação de uma classe de esfingolípídeo pelo aparecimento de uma banda castanha. No entanto uma vez que tanto se encontra na estirpe *wt* como na estirpe *ipt1Δ* pode-se concluir, à partida que não se trata de M(IP)₂C. Por comparação com outra cromatografia em camada fina obtida por outros autores, com o mesmo sistema de solventes, observa-se que se encontra abaixo da banda do MIPC, pelo que poderão ser outras sub-classes deste mesmo esfingolípídeo.

Após dois dias foi possível observar outras bandas, estando os resultados apresentados na figura 4.11.

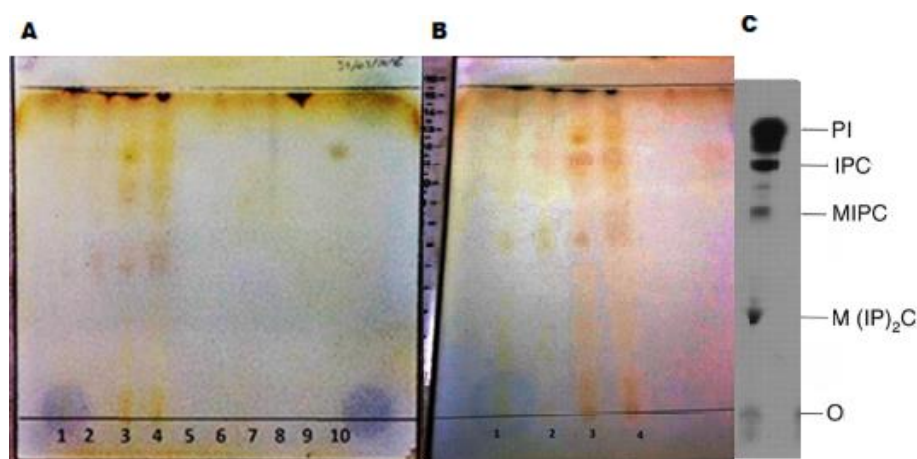


Figura 4.12 – Análise da hidrólise dos extratos de esfingolípídeos obtidos pelo método de Folch *et al.* das duas estirpes de levedura *S. cerevisiae* após 2 dias de revelação. Usaram-se placas de sílica-gel e o sistema de solventes 2. **1** – Extrato de esfingolípídeos de células *wt* com 6h de hidrólise; **2** – Extrato de esfingolípídeos de células *wt* com 8h de hidrólise; **3** – Extrato de esfingolípídeos de células *ipt1Δ* com 6h de hidrólise; **4** – Extrato de esfingolípídeos de células *ipt1Δ* com 8h de hidrólise; **5** – POPC; **6** – Liso-PC; **7** – PE; **8** – Éster de colesterol; **9** – Ergosterol; **10** – Ácido gordo. **O** – Origem de aplicação. Placa após a revelação com orcinol (**A**) e dois dias após ter sido revelada com orcinol (**B**). Está também representada a separação de esfingolípídeos usando o mesmo sistema de solvente realizada por Nakase *et al.*⁸⁷ (**C**).

Ao comparar a placa B com a cromatografia em camada fina obtida por Nakase *et al.* (placa C) observa-se que a banda que aparece após dois dias se encontra na zona do IPC, no entanto o orcinol não marca este esfingolípídeo visto que não possui nenhuma manose pelo que poderá ser uma sub-classe de MIPC com uma migração semelhante à do IPC.

Em estudos recentes⁸⁰ foram obtidos resultados que apontam para uma baixa eficiência na extração de esfingolípídeos, em especial do M(IP)₂C, pelo método de Folch *et al.*, podendo ser esta a razão pela qual não foi visível nenhuma banda correspondente a este esfingolípídeo. Assim, para que se obtenha o M(IP)₂C bem como os outros esfingolípídeos recorreu-se a dois métodos adicionais (o método de Ejlsing *et al.* (secção 3.5.2) e o método de Moehring *et al.* (secção 3.5.3)), tendo-se também modificado o método de Folch *et al.* (secção 3.5.1) usado anteriormente.

Os extratos de esfingolípídeos obtidos por estes métodos foram então analisados por TLC (figura 4.12).

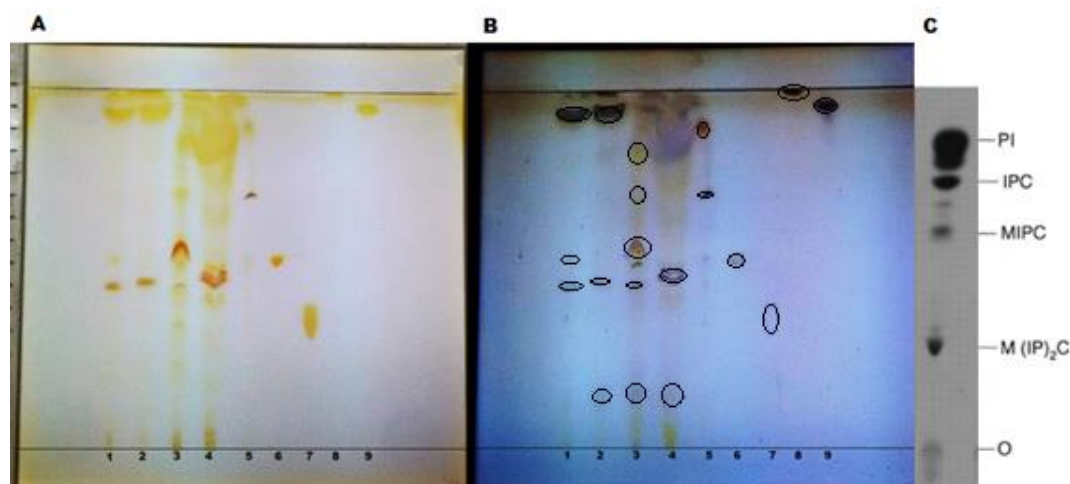


Figura 4.13 – Comparação de vários métodos de extração de esfingolípídeos da estirpe *wt* de levedura *S. cerevisiae* por TLC. Usaram-se placas de sílica-gel e o sistema de solventes 2. **1** – Extrato de esfingolípídeos obtidas pelo método de Folch *et al.* com 6h de hidrólise; **2** – Extrato de esfingolípídeos obtidas pelo método de Folch *et al.* com 8h de hidrólise; **3** – Extrato de esfingolípídeos obtidas pela variante do método de Folch *et al.* com 8h de hidrólise; **4** – Extrato de esfingolípídeos obtidas pelo método de Ejsing *et al.* com 8h de hidrólise; **5** – Extrato de esfingolípídeos obtidas pelo método de Moehring *et al.* com 2h de hidrólise; **6** – POPC; **7** – Liso-PC; **8** – Éster de colesterol; **9** – Ergosterol; **O** – Origem de aplicação. Os esfingolípídeos foram detetados com vapor de iodo (**A**) e com orcinol (**B**). Está também representada a separação de esfingolípídeos usando o mesmo sistema de solvente realizada por Nakase *et al.*⁸⁷ (**C**).

Demarcaram-se as bandas encontradas, tanto com vapor de iodo (placa A) como com orcinol (placa B) (figura 4.12) e foram calculados os fatores de retenção das bandas obtidas para os padrões utilizados (POPC, liso-PC, éster de colesterol e ergosterol) e da cromatografia obtida por Nakase *et al.*

Quadro 4.4 – Fatores de retenção das várias bandas obtidas para os extratos de esfingolípídeos, para TLC usada como comparação e para os padrões: POPC, Liso-PC, éster de colesterol, ergosterol. A distância entre o ponto de aplicação e a frente de solvente foi de 16 cm.

Identificação		R _F					
Amostras	Poço 1	-	0,44	0,52	-	-	0,94
	Poço 2	0,14	0,47	-	-	-	0,94
	Poço 3	0,14	0,45	0,55	0,70	0,81	-
	Poço 4	0,14	0,47	-	-	-	-
	Poço 5	-	-	-	0,70	0,89	-
Padrões	POPC	-	-	0,53	-	-	-
	Liso-PC	-	0,38	-	-	-	-
	Éster de colesterol	-	-	-	-	-	0,98
	Ergosterol	-	-	-	-	-	0,95
Nakas e <i>et al.</i> ⁸⁷	M(IP) ₂ C	-	0,30	-	-	-	-
	MIPC	-	-	0,60	-	-	-
	IPC	-	-	-	0,75	-	-

Pode-se observar, quer a partir das cromatografias quer a partir dos fatores de retenção, o aparecimento de uma banda perto da origem que é revelada apenas pelo orcinol. Isto seria um sinal de que se conseguiu extrair e identificar o esfingolípídeo complexo que se apresenta em maior quantidade na estirpe *wt*, o M(IP)₂C. Contudo uma banda com R_F muito semelhante foi revelada no poço 2, poço

que contém o extrato de esfingolípídeos obtidos pelo método de Folch *et al.* sujeito a uma hidrólise de 8h. Este extrato já tinha sido utilizado em cromatografias anteriores (figura 4.10 e 4.11) e em nenhum dos casos se conseguiu observar esta banda, pelo que é necessário confirmar este resultado e comparar com a estirpe *ipt1Δ*. As bandas que apareceram com R_F entre 0,45 e 0,60 podem ser subclasses de MIPC, visto que a revelação com iodo originou bandas castanhas, em vez do habitual amarelo, e foram também marcados pela revelação com orcinol. É de notar que tanto os ésteres de esteróis bem como os esteróis são marcados com o orcinol aparecendo a banda correspondente com uma cor escura.

É possível também observar uma mancha proveniente do poço 3 junto à frente de solvente que poderá ter influenciado a migração dos compostos não só do poço em que se encontra como dos poços adjacentes. Esta mancha, no entanto, é marcada com o orcinol pelo que se poderá tratar de uma grande quantidade de lípidos neutros. Relativamente ao poço 5 observam-se apenas duas bandas, sendo este um dos métodos mais usados para a extração de esfingolípídeos⁹⁵⁻⁹⁷. No entanto, neste caso particular a extração não terá sido suficiente uma vez que apenas se observam duas bandas, ao passo que na figura seguinte observa-se uma melhor separação no cromatograma.

De forma a ultrapassar os problemas referidos anteriormente realizaram-se novas extrações de esfingolípídeos, pelos mesmos métodos, tanto para a estirpe *wt* como para a estirpe *ipt1Δ*. Após a obtenção dos extratos de esfingolípídeos estes foram novamente analisados por cromatografia em camada fina.

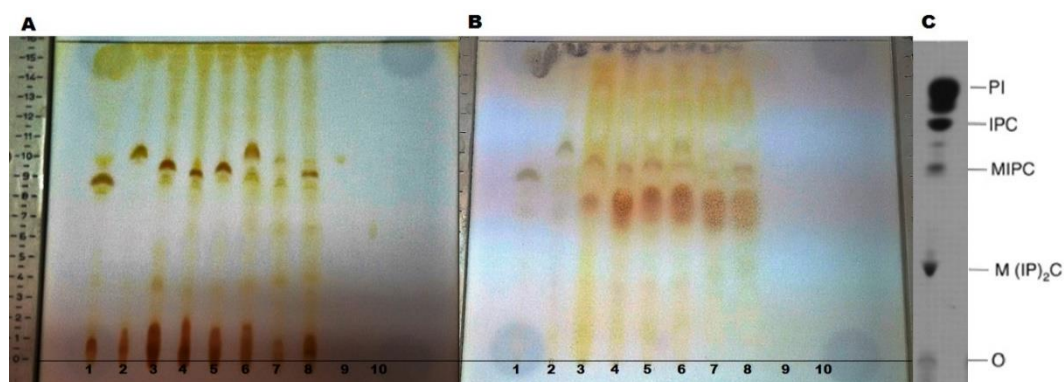


Figura 4.14 – Comparação de métodos de extração de esfingolípídeos das estirpes *wt* e *ipt1Δ* de levedura *S. cerevisiae*. Usaram-se placas de sílica-gel e o sistema de solventes 2. **1** – Estirpe *wt* obtidas pelo método de Folch *et al.* com 6h de hidrólise; **2** – Estirpe *ipt1Δ* obtidas pelo método de Folch *et al.* com 6h de hidrólise; **3** – Estirpe *wt* obtidas pela variante do método de Folch *et al.* com 6h de hidrólise; **4** – Estirpe *ipt1Δ* obtidas pela variante do método de Folch *et al.* com 6h de hidrólise; **5** – Estirpe *wt* obtidas pelo método de Ejsing *et al.* com 6h de hidrólise; **6** – Estirpe *ipt1Δ* obtidas pelo método de Ejsing *et al.* com 6h de hidrólise; **7** – Estirpe *wt* obtidas pelo método de Moehring *et al.* com 6h de hidrólise; **8** – Extrato de esfingolípídeos da estirpe *ipt1Δ* obtidas pelo método de Moehring *et al.* com hidrólise de 6h; **9** – POPC; **10** – Liso-PC; **O** – Origem de aplicação. Os esfingolípídeos foram detetados com vapor de iodo (**A**) e com orcinol (**B**). Está também representada a separação de esfingolípídeos usando o mesmo sistema de solvente realizada por Nakase *et al.*⁸⁷ (**C**).

Como se pode observar, tanto no cromatograma A como em B, existe uma grande concentração de bandas no nível médio da placa, que poderá corresponder a diferentes sub-classes de MIPC. Esta interpretação é feita com base nas revelações com orcinol (especialmente) e na comparação direta com a TLC realizada por Nakase *et al.* No entanto continua-se a não se observar nenhuma banda apenas para as amostras da estirpe *wt* mais próximo do ponto de aplicação provavelmente devido a uma baixa eficiência na extração dos esfingolípídeos, nomeadamente do esfingolípídeo $M(IP)_2C$. Fez-se a revelação da placa cromatográfica por abrasamento com ácido sulfúrico (figura 4.15) tendo-se obtido resultados idênticos à revelação com orcinol.

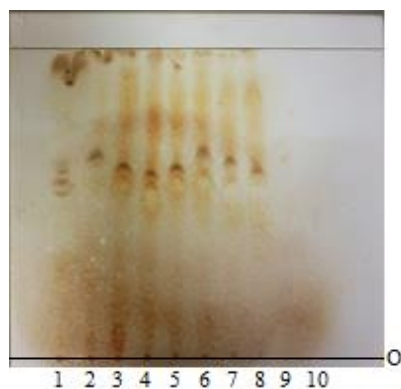


Figura 4.15 Comparação de métodos de extração de esfingolípídeos das estirpes *wt* e *ipt1Δ* de levedura *S. cerevisiae*. Usaram-se placas de sílica-gel e o sistema de solventes 2. 1 – Estirpe *wt* obtidas pelo método de Folch *et al.* com 6h de hidrólise; 2 – Estirpe *ipt1Δ* obtidas pelo método de Folch *et al.* com 6h de hidrólise; 3 – Estirpe *wt* obtidas pela variante do método de Folch *et al.* com 6h de hidrólise; 4 – Estirpe *ipt1Δ* obtidas pela variante do método de Folch *et al.* com 6h de hidrólise; 5 – Estirpe *wt* obtidas pelo método de Ejsing *et al.* com 6h de hidrólise; 6 – Estirpe *ipt1Δ* obtidas pelo método de Ejsing *et al.* com 6h de hidrólise; 7 – Estirpe *wt* obtidas pelo método de Moehring *et al.* com 6h de hidrólise; 8 – Extrato de esfingolípídeos da estirpe *ipt1Δ* obtidas pelo método de Moehring *et al.* com hidrólise de 6h; 9 – POPC; 10 – Liso-PC; O – Origem de aplicação. Os esfingolípídeos foram detetados por abrasamento com ácido sulfúrico.

Foram ainda calculados os fatores de retenção para as bandas obtidas no cromatograma anterior, estando os resultados representados no quadro 4.4.

Quadro 4.5 – Fatores de retenção das várias bandas obtidas para os extratos de esfingolípídeos, para TLC usada como comparação e para os padrões: POPC e Liso-PC. A distância entre o ponto de aplicação e a frente de solvente foi de 16 cm.

Identificação		R _F				
Amostras	Vapor de iodo	Poço 1	0,53	0,59	0,63	0,90
		Poço 2	-	-	0,67	0,96
		Poço 3	-	0,58	0,63	0,96
		Poço 4	0,55		0,60	0,96
		Poço 5	-	0,57	0,61	0,96
		Poço 6	-	0,58	0,67	0,96
		Poço 7	-	0,57	0,63	0,96
		Poço 8	0,55		0,60	0,96
	Orcinol	Poço 1	-		0,60	0,90
		Poço 2	-	-	0,67	0,96
		Poço 3	0,50	-	0,63	0,96
		Poço 4	0,49	-	0,61	0,96
		Poço 5	0,49	-	0,62	0,96
		Poço 6	0,49	-	0,61	0,96
		Poço 7	0,49	-	-	0,96
		Poço 8	0,49	-	0,60	0,96
Padrões	POPC	-	-	0,64	-	
	Liso-PC	0,46	-	-	-	
Nakas e <i>et al.</i> ⁸⁷	M(IP) ₂ C	0,30	-	-	-	
	MIPC	-	0,60	-	-	
	IPC	-	-	0,75	-	

4.6. Resistência a antifúngicos

Estudos anteriores mostraram que existe um aumento de resistência a antifúngicos, nomeadamente à nistatina⁵ e ao miconazol⁶ (antifúngicos de duas classes estruturais diferentes, como referido na secção 1.5), quando o M(IP)₂C não se encontra presente na membrana plasmática, o que indica que a estirpe *ipt1Δ* é mais resistente a antifúngicos que a estirpe *wt*.

Para avaliar essa resistência, foram então realizados teste de sensibilidade a estes fármacos não só para confirmar este aumento de resistência, mas também para observar as diferenças para as estirpes com duplas mutações (*csg2Δcsg1Δ* e *csg1Δcsh1Δ*), com o objetivo de relacionar a resistência a estes compostos com a composição em esfingolípidos.

Os solventes orgânicos podem perturbar a estabilidade da membrana plasmática tendo-se então averiguado a sua influência no crescimento celular das estirpes em estudo. Para isso adicionaram-se diferentes volumes dos solventes em estudo (etanol e metanol), estando os resultados obtidos apresentados na figura 4.14.

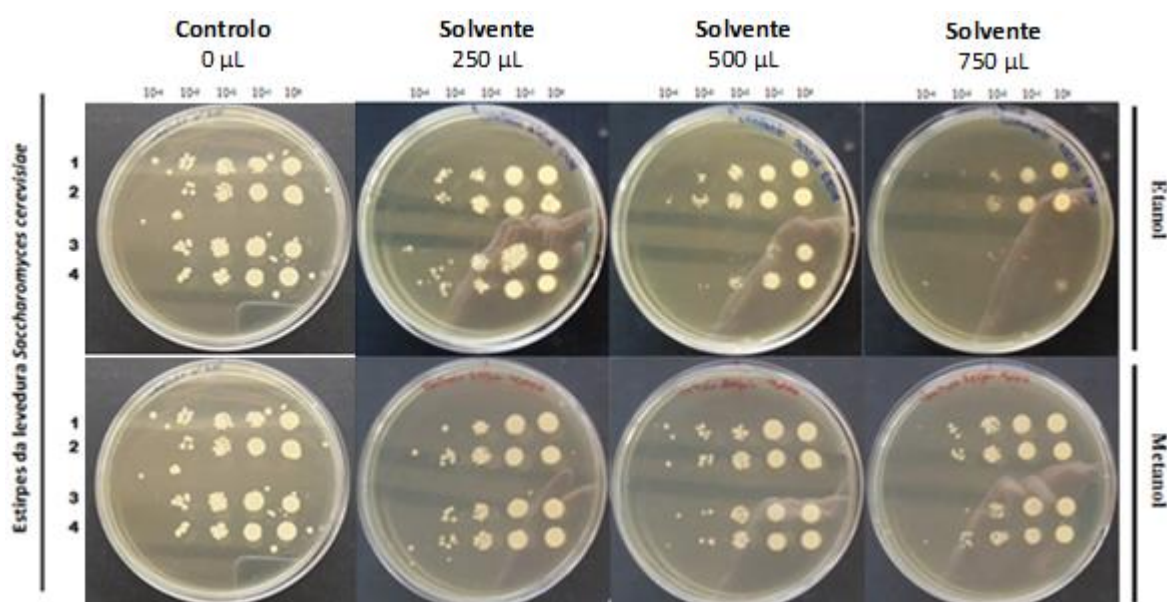


Figura 4.16 – Teste de sensibilidade de diferentes estirpes da levedura *S. cerevisiae* a dois solventes orgânicos. Foram usados três volumes diferentes (250, 500 e 750 µL que correspondem a 1,7 % (v/v), 3,3 % (v/v) e 5 % (v/v), respetivamente) de metanol e etanol. 1 – Estirpe *wt*; 2 – Estirpe *ipt1Δ*; 3 – Estirpe *csg2Δcsg1Δ*; 4 – Estirpe *csg1Δcsh1Δ*.

Através dos resultados obtidos é possível observar que o etanol tem um impacto acentuado no crescimento celular das quatro estirpes em estudo. Com o aumento da quantidade de etanol aplicado nota-se um decréscimo no crescimento celular em particular da estirpe *csg2Δcsg1Δ* e *csg1Δcsh1Δ*, não havendo crescimento de ambas as estirpes para um volume de 750 µL. A estirpe mais sensível a este solvente é a estirpe *csg2Δcsg1Δ*, que com 500 µL existe um crescimento muito baixo, e a estirpe *wt* e *ipt1Δ* são as mais resistentes, únicas em que existe crescimento para um volume de 750 µL.

Para os mesmos volumes observa-se que o metanol tem uma menor influência no crescimento, já que para os três volumes houve um crescimento idêntico para todas as estirpes. É de notar que apesar de ter um efeito mais reduzido, existe uma diminuição do crescimento com o aumento do volume. Assim para o estudo com os antifúngicos o melhor solvente a ser utilizado é o metanol, devendo-se ainda utilizar volumes inferiores a 250 µL de modo a introduzir o mínimo de perturbação possível na membrana e ter um efeito bastante inferior ao do antifúngico no crescimento do microrganismo.

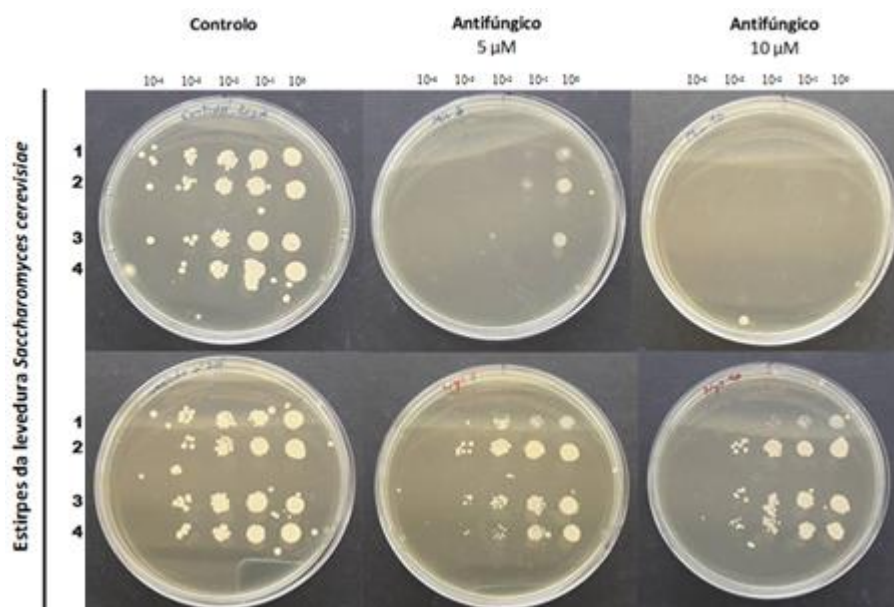


Figura 4.17 – Teste de sensibilidade a duas classes de antifúngicos de diferentes estirpes da levedura *S. cerevisiae*. Usaram-se duas concentrações de antifúngicos: 5 µM e 10 µM, painéis da esquerda e do meio, respetivamente, tendo a quantidade de solvente (metanol) sido igual para ambas as concentrações (50 µL). Os antifúngicos usados foram o miconazol, painéis superiores, e a nistatina, painéis inferiores. **1** – Estirpe *wt*; **2** – Estirpe *ipt1Δ*; **3** – Estirpe *csg2Δcsg1Δ*; **4** – Estirpe *csg1Δcsh1Δ*. Na esquerda encontram-se os controlos com solvente (mesma quantidade de solvente aplicada para as amostras) e sem solvente, painel superior e inferior, respetivamente.

Como se pode observar as estirpes *csg2Δcsg1Δ* e *csg1Δcsh1Δ* são também resistentes a estes antifúngicos, podendo-se também comprovar que a estirpe *wt* é a que apresenta menor resistência evidenciando que o M(IP)₂C poderá ser o fator determinante para o aparecimento de resistência a estes compostos. Comparando ambas as estirpes com duplas mutações *csg2Δcsg1Δ* e *csg1Δcsh1Δ*, a primeira aparenta ser mais resistente a ambos os antifúngicos utilizados, uma vez que tem um maior crescimento, enquanto a segunda não apresenta crescimento nas placas contendo o miconazol. Através dos resultados obtidos para as curvas de crescimento pode-se observar que as diferenças aqui registadas são devidas à atuação do antifúngico, já que o crescimento é bastante semelhante entre as várias estirpes. O fato de o miconazol atuar ao nível da síntese de ergosterol, como referido na secção 1.5, pode conferir-lhe uma maior toxicidade em menores concentrações ao passo que para a nistatina são necessárias maiores concentrações de modo a ocorrer a formação de poros. Através dos resultados é possível concluir que a estirpe *ipt1Δ* é a mais resistente a ambos os antifúngicos usados. É também visível que o miconazol tem um maior efeito, já que mesmo para uma baixa concentração (5 µM) existe um crescimento muito reduzido das várias estirpes.

5. Discussão

Este trabalho pode ser dividido em três partes principais. Na primeira parte, foram realizados estudos biofísicos de modo a estudar organização da membrana plasmática de duas estirpes (estirpe *wt* e estirpe *ipt1Δ*) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em particular as diferenças que advêm da ausência do esfingolípido complexo M(IP)₂C. Para a realização destes estudos procedeu-se à marcação da membrana plasmática da estirpe *wt*, estirpe que contém este esfingolípido, e da estirpe *ipt1Δ*, estirpe que não contém o esfingolípido, com a sonda di-4-ANEPPS. A segunda parte passou pela extração dos lípidos totais destas estirpes e posterior obtenção dos esfingolípidos, tendo sido necessário otimizar os processos de extração e de hidrólise. Após a obtenção pretendeu-se separar os esfingolípidos por classes através de uma cromatografia em camada fina. Na terceira e última parte pretendeu-se observar as diferenças em termos de resistência entre a estirpe *wt* da levedura *S. cerevisiae* e 3 mutantes biossintéticos (*ipt1Δ*; *csg2Δcsg1Δ*; *csg1Δcsh1Δ*) desta levedura, de modo a estabelecer uma possível relação entre os esfingolípidos completos da membrana plasmática e o surgimento de resistência àqueles antifúngicos.

5.1. Estudo biofísico da membrana plasmática da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Tal como referido nas secções 1.3.2 e 1.3.3, a composição lipídica da levedura pode ser variável. Diversos estudos do lipidoma de células da estirpe *ipt1Δ* mostraram que a ausência do esfingolípido complexo M(IP)₂C é compensada com o aumento dos esfingolípidos anteriores, nomeadamente do MIPC e do IPC, não sendo letal a ausência deste esfingolípido⁵. Foi também possível observar que na ausência deste esfingolípido, as células possuem uma maior resistência a diversos antifúngicos tais como a nistatina⁵ e o miconazol⁶, da classe dos polienos e dos azoles, respetivamente. Isto indica que o M(IP)₂C terá um papel preponderante na formação dos domínios da membrana em que ocorre a atuação destes antifúngicos^{5,43}. Para estudar então a influência deste esfingolípido na organização da membrana plasmática, realizou-se a sua caracterização biofísica com a sonda di-4-ANEPPS, de modo a averiguar se ocorriam alterações a nível dos domínios l_o.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a deleção do gene *ipt1* não afeta a presença de domínios, nem a presença de ergosterol na membrana plasmática da levedura, não sendo claro o papel do M(IP)₂C na formação e organização de domínios ordenados já que não são detetadas diferenças em nenhum dos parâmetros fotofísicos determinados ao longo deste trabalho. Contudo, tendo em conta de que se trata de uma sonda com grande sensibilidade para a presença de esteróis⁶⁹ é de esperar que não haja alterações entre a estirpe *wt* e a estirpe *ipt1Δ*. Isto prende-se com o facto de que ambas as estirpes possuem o mesmo conteúdo em ergosterol (esterol maioritário na levedura), tendo apenas diferenças a nível da composição em esfingolípidos.

No entanto, há que ter em consideração diversos fatores que podem estar a mitigar diferenças que possam existir entre estas duas estirpes. Uma vez que esta sonda já foi utilizada para estudar membranas de ergosterol/fosfatidilcolina e outros mutantes da mesma levedura é importante fazer uma comparação com os resultados obtidos neste trabalho.

Dos resultados obtidos por Bastos *et al.*⁶⁹ para três misturas binárias diferentes (DPPC/ergosterol, DOPC/ergosterol e POPC/ergosterol) observa-se que os mais idênticos com os obtidos neste trabalho são para sistemas binários de POPC/ergosterol com 10 e 40 mol % de estero. Assim o tempo de vida médio de fluorescência apresentado neste trabalho é de 2,60 ns ao passo que nos sistemas binários foi

obtido 2,00 ns e 2,65 ns para 10 e 40 mol % de ergosterol, respetivamente. Com esta análise pode-se concluir que a sonda se encontra em domínios l_o .

Aqueles autores realizaram um outro estudo com a mesma sonda usando duas estirpes da levedura *S. cerevisiae*, a estirpe *wt* e a estirpe *erg6Δ*. Esta estirpe não possui um enzima que catalisa um dos passos da via de biossíntese de ergosterol, havendo uma acumulação do seu precursor, o zimosterol e de um outro esterol, o colestatrienol³. Apesar desta ser uma alteração bastante significativa no lipidoma da célula, já que o zimosterol não consegue ter a mesma funcionalidade na membrana plasmática que o ergosterol devido à sua capacidade de induzir a formação de uma fase l_o , as diferenças entre os parâmetros fotofísicos são significativas mas não são dramáticas (tempo de vida médio de fluorescência de 2,58 ns e 2,76 ns para a estirpe *wt* e *erg6Δ*, respetivamente). Como referido anteriormente esta sonda é sensível ao nível e a diferentes tipos de esteróis pelo que seria de esperar grandes diferenças nos parâmetros calculados, porém isto não se verifica. Isto significa que as diferenças entre a estirpe *wt* e a estirpe *ipt1Δ* reportadas por esta sonda deverão ser ainda menores, dado o conteúdo idêntico em ergosterol, e que a haver diferenças substâncias em propriedades biofísicas será necessário recorrer a outras sondas para as detetar.

Outro estudo⁷ usando as mesmas estirpes, estirpe *wt* e a estirpe *ipt1Δ*, mas outros sondas, *t*-PnA e DPH, mostraram que existe uma alteração da ordem global da membrana quando não existe o esfingolípido $M(IP)_2C$, estando este possivelmente envolvido na formação dos domínios l_o . Todos estes resultados apontam para o que foi dito anteriormente, não sendo detetadas as diferenças pela sonda di-4-ANEPPS.

Um fator interessante é a tendência para maiores valores de anisotropia de fluorescência do di-4-ANEPPS para a estirpe *ipt1Δ* como referido na secção 4.1.3. Apesar de não ser um aumento significativo, estas diferenças indicam que a sonda se pode encontrar num ambiente mais rígido, tendo uma menor liberdade rotacional. O $M(IP)_2C$ possui uma cabeça bastante mais volumosa que os restantes esfingolípidos complexos permitindo um maior afastamento entre moléculas de lípido e maior liberdade nas respetivas cadeias acilo, conferindo também uma maior liberdade rotacional à sonda. Por outro lado, com a ausência deste esfingolípido, a membrana plasmática é formada maioritariamente por MIPC e IPC, que por terem uma cabeça menos volumosa ajudam na compactação da membrana. Assim a sonda vai se encontrar um ambiente mais rígido resultando em valores maiores de anisotropia. Experiências sobre a ação dos antifúngicos levaram a supor que o modo de ação de alguns destes compostos consiste na sua ligação ao ergosterol presente nas membranas fúngicas induzindo a formação de poros levando à libertação do conteúdo celular e consequente morte celular, indicando que os esteróis são importantes na resistência a estes compostos. Outros estudos mostram que estirpes em que há ausência do esfingolípido $M(IP)_2C$ possuem uma maior resistência a estes compostos comparativamente à estirpe *wt*. Estes dados indicam que a ação destes antifúngicos pode estar dependente de domínios ricos em $M(IP)_2C$ e ergosterol. Este esfingolípido, por possuir uma cabeça polar bastante grande, leva a supor que o volume livre entre as cadeias acilo seja ocupada pelo ergosterol, sendo facilitada a formação dos poros por ação dos antifúngicos, já que existe uma grande quantidade de esteróis na membrana plasmática de levedura. Quando não existe este esfingolípido a quantidade de ergosterol necessária para ocupar o espaço é menor havendo então um aumento da resistência aos antifúngicos. Os resultados obtidos indicam que não existe nenhuma variação no conteúdo em ergosterol apoiando a interpretação anterior.

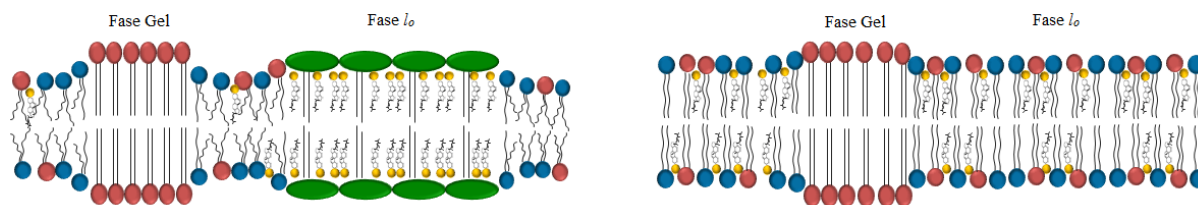


Figura 5.1 – Proposta da estrutura da membrana plasmática das estirpes *wt* (esquerda) e *ipt1Δ* (direita). Adaptado de [98] Pode-se observar a presença de fases gel em ambas as estirpes constituída por apenas esfingolípídeos e fase *l₀* constituída por esfingolípídeos e ergosterol. A verde está representado o M(IP)₂C, a vermelho o MIPC e IPC, a azul os glicerofosfolípídeos e a amarelo o ergosterol.

5.2. Análise dos extratos de esfingolípídeos

Sendo um dos objetivos para este trabalho a extração e purificação dos esfingolípídeos complexos foram testados diversos métodos procurando o mais adequado. Para além dos métodos de extração também foi otimizado o tempo de hidrólise de modo a obter-se a maior quantidade possível de esfingolípídeos e menor quantidade de glicerofosfolípídeos, tendo-se chegado ao tempo de 6 e 8 horas. Após este passo foram usados 4 métodos (método de Folch *et al.*, uma variante deste método, o método de Ejsing *et al.* e o método de Moehring *et al.*) para a extração de lípidos totais e posterior obtenção dos esfingolípídeos, sendo que para os métodos de Ejsing *et al.* e de Moehring *et al.* se obtiveram maiores quantidades de esfingolípídeo (quantificado pela quantidade de fosfato livre) para a mesma quantidade celular (2 μ mol para o método de Ejsing *et al.*, 1,5 μ mol para o método de Moehring *et al.* e 0,5 μ mol de fosfato livre para ambos os métodos de Folch *et al.*).

A quantidade de lípido aplicado nas cromatografias teve que ser aumentada uma vez que nenhuma banda foi observada (resultados não apresentados). Os principais problemas para a baixa eficiência na extração pelo método de Folch *et al.* podem passar pelo uso de cloreto de cálcio. Esta adição é feita para a remoção de material não lipídico que se encontra junto ao material lipídico; contudo esta adição pode ter um efeito contrário. Os esfingolípídeos complexos de levedura estão carregados negativamente (o M(IP)₂C possui 2 cargas negativas ao passo que o MIPC e o IPC possuem apenas uma) e a adição desta solução pode levar à formação de complexos entre o cálcio e os esfingolípídeos⁹⁹. Com a formação destes complexos os esfingolípídeos que estejam ligados ao cálcio deixam de ser solúveis no solvente orgânico, ficando então na fase aquosa sob a forma de agregados sendo perdidos durante o processo de extração. Para impedir que isto aconteça realizou-se o mesmo método tendo-se removido a adição de cálcio, de maneira a observar se se obtinha uma melhor extração. Sem a adição desta solução houve uma maior quantidade de material não lipídico que foi obtida juntamente com os esfingolípídeos, não sendo mais eficaz.

No geral nenhum destes métodos foi eficaz na extração dos esfingolípídeos pelo que foram usados outros métodos. Estudos usando o método de Ejsing *et al.* mostraram que existe uma maior extração dos esfingolípídeos, em particular do M(IP)₂C, comparativamente ao método de Folch *et al.* (extração quatro vezes mais eficiente)⁸⁰. Usando este método verificou-se uma melhor extração tendo-se obtido uma quantidade, através da quantificação de fosfato livre, duas vezes superior ao obtido para os outros dois métodos usados, tendo-se obtido valores semelhantes para o método de Moehring *et al.* Apesar de não ser ter obtido uma extração eficiente, estes processos são bastante complexos e por isso pequenas variações podem alterar o resultado obtido. Os resultados de Hanson e Lester⁵⁹ comprovam o que foi dito anteriormente, em que variações na temperatura podem reduzir significativamente a eficiência de extração podendo mesmo levar a que não seja detetado o M(IP)₂C, por exemplo.

Outro fator bastante importante passa pela marcação das bandas obtidas. Assim, apesar de uma melhoria na qualidade da extração, continuam a não ser detetadas as bandas correspondentes ao $M(IP)_2C$ em nenhum dos métodos usados. Isto pode então dever-se ao fato de não existir nenhum revelador específico para os esfingolípídeos complexos, sendo por isso necessário ter uma grande concentração de esfingolípido para ser possível a observação.

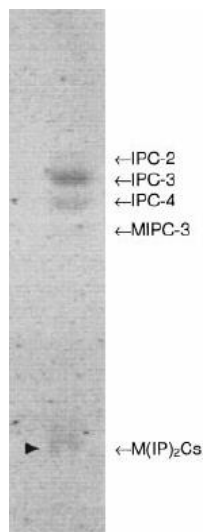


Figura 5.2 – Cromatograma obtido por Dickson *et al.*¹⁰⁰ para extratos de levedura *S. cerevisiae* da estirpe *wt*. A revelação foi feita com orcinol seguida por autoradiografia. O triângulo indica o local revelado pelo orcinol.

Como se pode observar pelo cromatograma acima representado, a revelação destes esfingolípídeos é bastante complicada sendo necessárias grandes quantidades de lípido ou marcação radioativa. Também por isso quase todos os resultados encontrados na literatura são obtidos com recurso ao inositol tritiado. Assim, é possível uma marcação muito mais eficiente e aquando da revelação por autoradiografia vão ser apenas detetados os compostos contendo inositol, como é o caso dos esfingolípídeos. No entanto como referido anteriormente, um dos objetivos deste trabalho passou pela obtenção de cada classe de esfingolípídeos isolada e por isso é preciso ver tudo o que se encontra na placa, obtendo assim cromatogramas muito mais complexos, para que seja possível extrair o que se pretende. Foi por isso que se recorreu a um revelador universal, o iodo, e posteriormente a uma solução de orcinol e ao abrasamento com ácido sulfúrico. Não se tratando de uma marcação específica existe sempre a possibilidade de existirem falsos positivos devido à grande quantidade de lípido que é preciso aplicar.

Os resultados aqui descritos serão importantes para continuar a otimização destes métodos, podendo esta passar pela introdução de um passo adicional de purificação, de modo a remover material não lipídico, ou uma extração mais prolongada, garantindo uma maior quantidade de esfingolípido.

5.3. Resistência a antifúngicos

Os álcoois podem ter um efeito bastante pronunciado nas membranas biológicas. A presença destes compostos leva a uma perturbação do estado natural em que a membrana se encontra podendo mesmo haver moléculas que se insiram na membrana. Como se pode observar pela figura 4.15 tanto o metanol como o etanol têm efeito na destabilização da membrana levando a um menor crescimento. No entanto, o impacto destes dois compostos não é igual, já que o etanol tem um efeito muito mais acentuado na destabilização da membrana. Estudos¹⁰¹ apontam para que a introdução de álcoois leva a um aumento da área por lípido, e consequentemente leva a uma maior permeabilidade da membrana,

sendo este aumento maior para o etanol. A regra de Traube^{102,103} diz que a adição de cada novo grupo CH₂ leva a uma diminuição da tensão superficial e tem por isso um maior efeito nas interações com a membrana. Isto aliado ao facto de o metanol não conseguir penetrar na membrana, uma vez que é mais polar que o etanol explica os efeitos observados na figura 4.15.

Após o estudo anterior foi-se então averiguar o efeito dos antifúngicos nas diversas estirpes tendo-se usado o metanol como solvente por ser o que tem menor impacto no crescimento das células. A estirpe *ipt1Δ* é a mais resistente a ambos os antifúngicos, e a estirpe *wt* como a menos resistente. As estirpes com duplas mutações mostraram ambas uma sensibilidade intermédia relativamente às duas estirpes anteriores. Este resultado realça a importância dos esfingolípidos na ação destes antifúngicos, cujo alvo clássico é o ergosterol. Também foi possível observar que dos dois compostos utilizados o miconazol é o mais eficiente para a inibição do crescimento celular. Uma vez que este composto atua a nível da síntese do ergosterol poderão ser necessárias menores quantidades de composto para uma inibição do crescimento. Uma ação eficiente da nistatina requer a sua acumulação na membrana plasmática de forma a permitir a formação de agregados que depois se poderão organizar em poros, necessitando assim de uma maior quantidade de composto para que isto seja possível. Será igualmente interessante estudar as propriedades biofísicas dos duplos mutantes para se poder fazer uma comparação entre a organização da membrana e a resistência a antifúngicos.

6. Conclusão e perspectivas futuras

O folheto externo da membrana plasmática de levedura é constituído essencialmente por esfingolípidos e ergosterol, havendo a formação de diferentes domínios. Os esfingolípidos já se revelaram bastante importantes para o normal funcionamento da célula bem como para a resistência a antifúngicos. Assim é importante perceber qual o papel dos esfingolípidos na organização da membrana plasmática (formação de domínios) tendo-se marcado a membrana plasmática com uma sonda fluorescente. Pretendeu-se também extrair os esfingolípidos complexos e verificar o comportamento da estirpe *wt* e *ipt1Δ* na presença de antifúngicos e observar as diferenças entre estas estirpes e os duplos mutantes *csg2Δcsg1Δ* e *csg1Δcsh1Δ* para futuramente estabelecer relações entre classes de esfingolípidos, propriedades biofísicas da membrana e ação de antifúngicos.

Os estudos biofísicos realizados não foram conclusivos quanto ao efeito que a deleção do gene *ipt1* tem na organização da membrana. No entanto, a conjugação dos resultados aqui apresentados com outros obtidos com sondas cuja partição se dará preferencialmente para outro tipo de domínios permite inferir qual a influência do M(IP)₂C na organização da membrana plasmática. Assim, em conjunto, os estudos biofísicos realizados com células *ipt1Δ* são consistentes com um modelo em que o M(IP)₂C, por ter uma cabeça muito volumosa, forma, juntamente com o ergosterol, domínios l_o havendo o recrutamento de uma quantidade elevada de ergosterol de maneira a preencher os espaços livres entre as cadeias acilo. Na ausência deste esfingolípido não é necessária uma quantidade tão elevada de ergosterol para preencher o espaço livre entre as cadeias acilo dos esfingolípidos (MIPC/IPC). Assim existe mais ergosterol livre pelo que vai haver uma maior distribuição deste esteroide pela membrana plasmática (figura 5.1). Esta alteração na distribuição do ergosterol poderá ajudar a explicar a maior resistência das células *ipt1Δ* a nistatina e ao miconazol. O fato de não se observar diferenças nos domínios l_o pode também ser devida a alterações a nível da composição de outros lípidos, nomeadamente dos glicerofosfolípidos, que não são detetáveis pela análise por TLC, mas que são suficientes para mitigar as alterações induzidas pela ausência dos esfingolípidos nestes domínios. Isto demonstra a necessidade do uso de diversas sondas para a caracterização biofísica das membranas, de modo a se obter uma melhor descrição da organização da membrana.

Foi ainda possível otimizar o tempo de hidrólise dos glicerofosfolípidos, tendo-se também observado qual o melhor método para a extração de lípidos. Através desse estudo observou-se que com os métodos de Ejlsing *et al.* e de Moehring *et al.* se obtinha uma maior quantidade de esfingolípidos sendo os métodos mais eficazes para a extração de esfingolípidos, apesar de ser importante que estes métodos sejam otimizados de modo a se conseguir uma melhor e mais eficaz extração e posterior obtenção dos esfingolípidos complexos. Estes esfingolípidos serão, posteriormente, separados por TLC, sendo cada banda identificada por espectrometria de massa.

Outra forma de obter os esfingolípidos complexos numa forma muito mais pura será através do isolamento prévio da membrana plasmática por ultracentrifugação para posterior extração dos lípidos. A partir deste método é possível obter extratos muito mais ricos em esfingolípidos complexos já que a quase totalidade destes lípidos se encontra na membrana plasmática. No entanto, serão precisos grandes volumes de cultura celular para se obter uma quantidade razoável de lípido. Outra vantagem deste método de isolamento é o fato de se poder realizar estudos biofísicos diretamente na membrana plasmática não havendo o risco de marcar as membranas internas. Este problema poderá acontecer com a sonda di-4-ANEPPS que, pode ser facilmente internalizada, e ao marcar as membranas internas não vai reportar quaisquer diferenças, já que estas membranas são mais pobres quer em ergosterol quer em esfingolípidos. Uma alternativa poderá passar pela utilização de sondas com cadeias alquila maior, como

a di-8-ANEPPS, e/ou sondas catiónicas, como a di-12-ANEPPDHQ, que ficarão mais tempo retidas na superfície celular.

Após todo este processo era possível obter com os diferentes esfingolípídeos isolados podendo-se reconstituir em bicamadas lipídicas binárias POPC/esfingolípido e ternárias POPC/esfingolípídeos/ergosterol de modo a estudar as suas propriedades biofísicas (nomeadamente tipo de domínios formados, grau de compactação da bicamada, ordem, hidratação e espessura). Outro aspeto relevante que advém deste isolamento e identificação será a possibilidade de preparar sistemas de membranas contendo vários esfingolípídeos, fosfolípídeos e ergosterol em proporções bem determinadas para mimetizar de forma mais fiel a membrana plasmática da levedura. A reconstituição de esfingolípídeos nestas várias bicamadas lipídicas com diferentes graus de complexidade pode ainda servir de base para estudar a interação entre diferentes agentes antifúngicos e a membrana plasmática da levedura de forma mais quantitativa para elucidar o seu modo de ação. A partir das misturas acima referidas é possível o estudo por espectroscopia de fluorescência em LUVs e por microscopia confocal em GUVs marcando estas vesículas com uma sonda.

Em suma, globalmente considera-se que os objetivos deste trabalho foram atingidos, tendo-se feito progressos significativos quer na extração dos esfingolípídeos complexos da membrana de levedura quer a respeito da relação entre estes esfingolípídeos e a resistência a antifúngicos. No entanto, este é um trabalho que terá continuação, uma vez que ainda existem questões a aberto, algumas delas decorrentes dos resultados apresentados ao longo desta tese, nomeadamente sobre qual a melhor forma de obter cada classe de esfingolípido purificada e qual o papel da organização dos microdomínios de membrana nos mecanismos de resistência.

7. Referências bibliográficas

1. de Almeida RFM, Joly E, Crystallization around solid-like nanosized docks can explain the specificity, diversity, and stability of membrane microdomains. *Front. Plant Sci.* 5, (2014).
2. Stillwell W, An Introduction to Biological Membranes: From Bilayers to Rafts, Elsevier Science, 2013.
3. Aresta-Branco F, Cordeiro AM, Marinho HS, Cyrne L, Antunes F, de Almeida RFM., Gel domains in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: highly ordered, ergosterol-free, and sphingolipid-enriched lipid rafts., *J. Biol. Chem.* 286 5043–54 (2011).
4. Mukhopadhyay K, Prasad T, Saini P, Pucadyil TJ, Chattopadhyay A, Prasad R Chattopadhyay, R. Prasad, Membrane sphingolipid-ergosterol interactions are important determinants of multidrug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1778–1787 (2004).
5. Leber A, Fischer P, Schneiter R, Kohlwein SD, Daum G, The yeast mic2 mutant is defective in the formation of mannosyl-diinositolphosphorylceramide., *FEBS Lett.* 411, 211–214 (1997).
6. François IE, Bink A, Vandercappellen J, Ayscough KR, Toulmay A, Schneiter R, van Gyseghem E, Van den Mooter G, Borgers M, Vandenbosch D, Coenye T, Cammue BP, Thevissen K. Membrane Rafts Are Involved in Intracellular Miconazole Accumulation in Yeast Cells. *J. Biol. Chem.* 284, 32680–32685 (2009).
7. Antunes, CSAC, Papel dos esfingolípidos complexos na organização da membrana plasmática da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa Tese de Mestrado, (2013).
8. Marquês JT, Cordeiro AM, Viana AS, Herrmann A, Marinho HS, de Almeida RFM, Formation and Properties of Membrane-Ordered Domains by Phytoceramide: Role of Sphingoid Base Hydroxylation. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 31, 9410–9421 (2015).
9. Castro IVR, Molecular biophysics as a tool to develop improved lipid-based Nystatin-delivery systems. Relatório de Projeto III, Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UL (2013)
10. Cooper GM, Hausman RE, The Cell: A Molecular Approach, 5th Edition, Sinauer Associates, Inc., 2009.
11. Loura LMS, de Almeida, RFM, Tópicos de Biofísica de Membranas. Lidel, 2004.
12. Shan Y, Wang H, The structure and function of cell membranes examined by atomic force microscopy and single-molecule force spectroscopy. *Chem. Soc. Rev.* 44, 3617–3638 (2015).
13. Hoppe W, Lohmann W, Markl H, Ziegler H, Biophysics, Springer Berlin Heidelberg, 1983.
14. Nicholson GL, The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 1451–1466 (2014).
15. Nelson DL, Cox MM, Lehninger Principles of Biochemistry, 5th Edition, W. H. Freeman and Company, New York, USA, 2008.
16. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, Molecular Biology of the Cell, 4th Edition, Garland Science, New York, USA, 2002.

17. Malinsky J, Opekarová M, Grossmann G, Tanner W, Membrane microdomains, rafts, and detergent-resistant membranes in plants and fungi. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 501–529 (2013).
18. Pike LJ, Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* 47, 1597–1598 (2006).
19. Simons K, Vaz, WLC, Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33, 269–295 (2004).
20. Simons K, Sampaio JL, Membrane Organization and Lipid Rafts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (2011).
21. Roberts GCK, *Encyclopedia of Biophysics*, 2013th Edition, Springer, 2013
22. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW, Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 112–124 (2008).
23. Monteiro N, Martins A, Reis RL, Neves NM, Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *J. R. Soc. Interface* 11, 20140459 (2014).
24. Eeman M, Deleu M, From biological membranes to biomimetic model membranes. *Rev. Biotechnol. Agron. Société Environ.* Volume 14 (2010).
25. Begley TP, *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* (John Wiley & Sons, Inc., 2007).
26. McMullen TPW, Lewis RNAH, McElhaney RN, Cholesterol–phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 8, 459–468 (2004).
27. Karathia H, Vilaprinyo E, Sorribas A, Alves R, *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *PLoS ONE* 6, (2011).
28. Daum G, Lees ND, Bard M, Dickson R, Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1471–1510 (1998).
29. Klose C, Surma MA, Gerl MJ, Meyenhofer F, Shevchenko A, Simons K, Flexibility of a Eukaryotic Lipidome – Insights from Yeast Lipidomics. *PLoS One.* 7 (2012) e35063.
30. Sherman F, Getting started with yeast. *Methods in Enzymology* 350, 3–41 (2002).
31. Váchová L, Cáp M, Palková Z, Yeast colonies: a model for studies of aging, environmental adaptation, and longevity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 601836 (2012).
32. Werner-Washburne M, Braun EL, Crawford ME, Peck VM, Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 19, 1159–1166 (1996).
33. Rolfe MD, Rice CJ, Lucchini S, Pin C, Thompson A, Cameron AD, Alston M, Stringer MF, Betts RP, Baranyi J, Peck MW, Hinton JC, Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *J. Bacteriol.* 194, 686–701 (2012).
34. Haurie V, Perrot M, Mini T, Jenö P, Sagliocco F, Boucherie H, The transcriptional activator Cat8p provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276, 76–85 (2001).
35. Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, Nishijima M, Raetz CR, Shimizu T, Spener F, van Meer G, Wakelam MJ, Dennis EA, Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 50 Suppl, S9-14 (2009).

36. Zinser E, Sperka-Gottlieb CD, Fasch EV, Kohlwein SD, Paltauf F, Daum G, Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 173, 2026–2034 (1991).
37. Tuller G, Nemec T, Hrastnik C, Daum G, Lipid composition of subcellular membranes of an FY1679-derived haploid yeast wild-type strain grown on different carbon sources. Yeast, 15, 1555–1564 (1999).
38. Patton JL, Lester RL, The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces cerevisiae* are highly localized in the plasma membrane. J. Bacteriol. 173, 3101–3108 (1991).
39. Blagović B, Rupčić J, Mesarić M, Marić V, Lipid analysis of the plasma membrane and mitochondria of brewer's yeast. Folia Microbiol. (Praha) 50, 24–30 (2005).
40. Ikeda M, Kihara A, Denpoh A, Igarashi Y, The Rim101 pathway is involved in Rsb1 expression induced by altered lipid asymmetry. Mol. Biol. Cell 19, 1922–1931 (2008).
41. Fadeel B, Xue D, The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 44, 264–277 (2009).
42. Cerantola V, Vionnet C, Aebischer OF, Jenny T, Knudsen J, Conzelmann A, Yeast sphingolipids do not need to contain very long chain fatty acids. Biochem. J. 401, 205–216 (2007).
43. Montefusco DJ, Matmati N, Hannun YA, The yeast sphingolipid signaling landscape. Chem. Phys. Lipids 177, 26–40 (2014).
44. Haak D, Gable K, Beeler T, Dunn T, Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* Ceramides Requires Sur2p and Scs7p. J. Biol. Chem. 272, 29704–29710 (1997).
45. Uemura S, Kihara A, Iwaki S, Inokuchi J, Igarashi Y, Regulation of the Transport and Protein Levels of the Inositol Phosphorylceramide Mannosyltransferases Csg1 and Csh1 by the Ca²⁺-binding Protein Csg2. J. Biol. Chem. 282, 8613–8621 (2007).
46. Dickson RC, Lester RL, Yeast sphingolipids. Biochim. Biophys. Acta 1426, 347–357 (1999).
47. Obeid LM, Okamoto Y, Mao C, Yeast sphingolipids: metabolism and biology. Biochim. Biophys. Acta 1585, 163–171 (2002).
48. Dickson RC, Lester RL, Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta 1583, 13–25 (2002).
49. Singh A, Del Poeta M, Sphingolipidomics: An Important Mechanistic Tool for Studying Fungal Pathogens. Front. Microbiol. 7, (2016).
50. Jenkins GM, Richards A, Wahl T, Mao C, Obeid L, Hannun Y, Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 272, 32566–32572 (1997).
51. Luberto C, Toffaletti DL, Wills EA, Tucker SC, Casadevall A, Perfect JR, Hannun YA, Del Poeta M, Roles for inositol-phosphoryl ceramide synthase 1 (IPC1) in pathogenesis of *C. neoformans*. Genes Dev. 15, 201–212 (2001).
52. Rittershaus PC, Kechichian TB, Allegood JC, Merrill AH Jr, Hennig M, Luberto C, Del Poeta M, Glucosylceramide synthase is an essential regulator of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Invest. 116, 1651–1659 (2006).
53. Nes WR, Sekula BC, Nes WD, Adler JH, The functional importance of structural features of ergosterol in yeast. J. Biol. Chem. 253, 6218–6225 (1978).

54. Khmelinskaia A, Antunes C, Bastos A, Scolari S, Lobo GM, Cyrne L, Malhó R, Herrmann A, Marinho HS, de Almeida RFM, Plasma Membrane Sterols Evolved Towards Liquid Ordered Phase Formation. (in preparation).
55. Neumann A, Baginski M, Czub J, How do sterols determine the antifungal activity of amphotericin B? Free energy of binding between the drug and its membrane targets. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 18266–18272 (2010).
56. Baginski M, Sternal K, Czub J, Borowski E, Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. *Acta Biochim. Pol.* 52, 655–658 (2005).
57. Pedroso N1, Matias AC, Cyrne L, Antunes F, Borges C, Malhó R, de Almeida RF, Herrero E, Marinho HS, Modulation of plasma membrane lipid profile and microdomains by H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 289–298 (2009).
58. Bligh EG, Dyer WJ, A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917 (1959).
59. Hanson BA, Lester RL, The extraction of inositol-containing phospholipids and phosphatidylcholine from *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa*. *J. Lipid Res.* 21, 309–315 (1980).
60. Wilson ID, Poole C, Handbook of Methods and Instrumentation in Separation Science. Academic Press, 2009.
61. Guan XL, Riezman I, Wenk MR, Riezman H, Yeast Lipid Analysis and Quantification by Mass Spectrometry. *Methods Enzymol* 470, 369–391 (2010).
62. Grossmann G, Opekarová M, Malinsky J, Weig-Meckl I, Tanner W, Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J.* 26, 1–8 (2007).
63. Ziółkowska NE, Christiano R, Walther TC, Organized living: formation mechanisms and functions of plasma membrane domains in yeast. *Trends Cell Biol.* 22, 151–158 (2012).
64. Malinsky J, Opekarová M, Tanner W, The lateral compartmentation of the yeast plasma membrane. *Yeast* 27, 473–478 (2010).
65. Berchtold D, Walther TC, TORC2 Plasma Membrane Localization Is Essential for Cell Viability and Restricted to a Distinct Domain. *Mol. Biol. Cell* 20, 1565–1575 (2009).
66. de Almeida RFM, Loura LMS, Prieto M, Membrane lipid domains and rafts: current applications of fluorescence lifetime spectroscopy and imaging. *Chem. Phys. Lipids* 157, 61–77 (2009).
67. Bastos AEP, Scolari S, Stöckl M, de Almeida RFM, Applications of fluorescence lifetime spectroscopy and imaging to lipid domains in vivo. *Methods Enzymol.* 504, 57–81 (2012).
68. Cohen JA, Gabriel B, Teissié J, Winterhalter M, Transmembrane voltage sensor Membrane Science and Technology 7, 847–886 (2003).
69. Bastos AEP, Marinho HS, Cordeiro AM, de Soure AM, de Almeida RFM, Biophysical properties of ergosterol-enriched lipid rafts in yeast and tools for their study: characterization of ergosterol/phosphatidylcholine membranes with three fluorescent membrane probes. *Chem. Phys. Lipids* 165, 577–588 (2012).
70. Lakowicz JR, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3th Edition, Springer Science, New York, USA, 2006.

71. Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT, Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. *Int. J. Microbiol.* 2012, 1–26 (2012).
72. Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindós G, Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev. Esp. Quimioter. Publ. Of. Soc. Esp. Quimioter.* 19, 130–139 (2006).
73. Mor V, Rella A, Farnoud AM, Singh A, Munshi M, Bryan A, Naseem S, Konopka JB, Ojima I, Bullesbach E, Ashbaugh A, Linke MJ, Cushion M, Collins M, Ananthula HK, Sallans L, Desai PB, Wiederhold NP, Fothergill AW, Kirkpatrick WR, Patterson T, Wong LH, Sinha S, Giaever G, Nislow C, Flaherty P, Pan X, Cesar GV, de Melo Tavares P, Frases S, Miranda K, Rodrigues ML, Luberto C, Nimrichter L, Del Poeta M, Identification of a New Class of Antifungals Targeting the Synthesis of Fungal Sphingolipids. *MBio.* 6, e00647-15 (2015).
74. Hąc-Wydro K, Dynarowicz-Łątka P, Interaction between nystatin and natural membrane lipids in Langmuir monolayers—The role of a phospholipid in the mechanism of polyenes mode of action. *Biophys. Chem.* 123, 154–161 (2006).
75. Récamier KS, Hernández-Gómez A, González-Damián J, Ortega-Blake I, Effect of membrane structure on the action of polyenes: I. Nystatin action in cholesterol- and ergosterol-containing membranes. *J. Membr. Biol.* 237, 31–40 (2010).
76. Palacios J, Serrano R, Proton permeability induced by polyene antibiotics. *FEBS Lett.* 91, 198–201 (1978).
77. Francois IEJA, Cammue BPA, Borgers M, Ausma J, Dispersyn GD, Thevissen K, Azoles: Mode of Antifungal Action and Resistance Development. Effect of Miconazole on Endogenous Reactive Oxygen Species Production in *Candida albicans*. *Anti-Infect. Agents Med. Chem.* 5, 3–13 (2006).
78. Ghannoum MA, Rice LB, Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 501–517 (1999).
79. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509 (1957).
80. Ejsing CS, Sampaio JL, Surendranath V, Duchoslav E, Ekroos K, Klemm RW, Simons K, Shevchenko A Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2136–2141 (2009).
81. Ejsing CS, Moehring T, Bahr U, Duchoslav E, Karas M, Simons K, Shevchenko A Collision-induced dissociation pathways of yeast sphingolipids and their molecular profiling in total lipid extracts: a study by quadrupole TOF and linear ion trap-orbitrap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* JMS 41, 372–389 (2006).
82. Rouser G, Fkeischer S, Yamamoto A, Two dimensional then layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5, 494–496 (1970).
83. McClare CW, An accurate and convenient organic phosphorus assay. *Anal. Biochem.* 39, 527–530 (1971).
84. Johnson I, *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 11th Edition. (Life Technologies Corporation, 2010).
85. Marquardt D, An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 11, 431–441 (1963).

86. Stahl E, Thin-Layer Chromatography. Springer, Berlin, Heidelberg, Germany, 1969.
87. Nakase M, Tani M, Morita T, Kitamoto HK, Kashiwazaki J, Nakamura T, Hosomi A, Tanaka N, Takegawa K, Mannosylinositol phosphorylceramide is a major sphingolipid component and is required for proper localization of plasma-membrane proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. J. Cell Sci. 123, 1578–1587 (2010).
88. Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J, Kowalska T, Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. CRC Press, 2008.
89. Baldwin E, Bell DJ, Cole's Practical Physiological Chemistry. W. Heffer and Sons Ltd, 1955.
90. Owen DM, Lanigan PM, Dunsby C, Munro I, Grant D, Neil MA, French PM, Magee AI, Fluorescence lifetime imaging provides enhanced contrast when imaging the phase-sensitive dye di-4-ANEPPDHQ in model membranes and live cells. Biophys. J. 90, L80-82 (2006).
91. Jin L, Millard AC, Wuskell JP, Dong X, Wu D, Clark HA, Loew LM, Characterization and Application of a New Optical Probe for Membrane Lipid Domains. Biophys. J. 90, 2563–2575 (2006).
92. Santos FC, Fernandes AS, Antunes CAC, Moreira FP, Videira A, Marinho HS, de Almeida RFM, Reorganization of plasma membrane lipid domains during conidial germination. Biochim. Biophys. Acta. (2016).
93. Schnitzer R, Daum G, Analysis of yeast lipids. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 313, 75–84 (2006).
94. Smith I, Seakins JWT, Chromatographic and Electrophoretic Techniques: Paper and thin layer chromatography, W. Heinemann Medical Books, 1976.
95. Gaigg B, Toulmay A, Schnitzer R, Very Long-chain Fatty Acid-containing Lipids rather than Sphingolipids per se Are Required for Raft Association and Stable Surface Transport of Newly Synthesized Plasma Membrane ATPase in Yeast. J. Biol. Chem. 281, 34135–34145 (2006).
96. Bagnat M, Keränen S, Shevchenko A, Shevchenko A, Simons K, Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 3254–3259 (2000).
97. Malathi K, Higaki K, Tinkelenberg AH, Balderes DA, Almanzar-Paramio D, Wilcox LJ, Erdeniz N, Redican F, Padamsee M, Liu Y, Khan S, Alcantara F, Carstea ED, Morris JA, Sturley SL, Mutagenesis of the putative sterol-sensing domain of yeast Niemann Pick C–related protein reveals a primordial role in subcellular sphingolipid distribution. J Cell Biol 164, 547–556 (2004).
98. Marquês JT, Antunes, CAC, Santos FC, de Almeida RFM, Biomembrane Organization and Function: The Decisive Role of Ordered Lipid Domains 22, 65–96 (2015).
99. Björkbohm A, Ohvo-Rekilä H, Kankaanpää P, Nyholm TK, Westerlund B, Slotte JP Characterization of membrane properties of inositol phosphorylceramide. Biochim. Biophys. Acta 1798, 453–460 (2010).
100. Dickson RC, Nagiec EE, Wells GB, Nagiec MM, Lester RL, Synthesis of mannose-(inositol-P)2-ceramide, the major sphingolipid in *Saccharomyces cerevisiae*, requires the IPT1 (YDR072c) gene. J. Biol. Chem. 272, 29620–29625 (1997).
101. Patra M, Salonen E, Terama E, Vattulainen I, Faller R, Lee BW, Holopainen J, Karttunen M, Under the Influence of Alcohol: The Effect of Ethanol and Methanol on Lipid Bilayers. Biophys. J. 90, 1121–1135 (2006).
102. Adamson AW, Gast AP, Physical Chemistry of Surfaces, Wiley-Interscience, 1997.

103. Traube J, Ueber die Capillaritätsconstanten organischer Stoffe in wässrigen Lösungen. Justus Liebigs Ann. Chem. 265, 27–55 (1891).